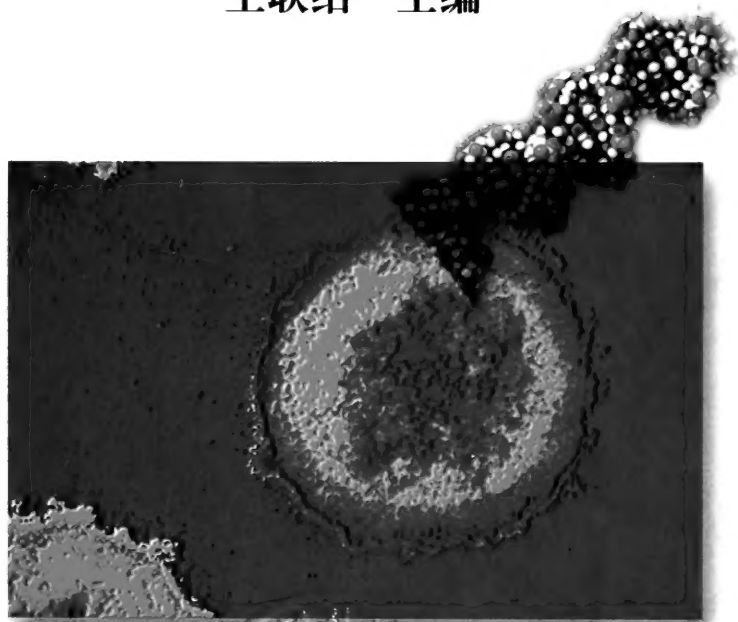


高·等·院·校·选·用·教·材

(修订版)

生物化学与分子生物学 原理

王联结 主编



科学出版社

www.sciencep.com

Digitized by the Internet Archive
in 2011 with funding from
Institute of Botany, CAS and Internet Archive

<http://www.archive.org/details/shengwuhuaxueyuf00wang>

中科院植物所图书馆



S0003526

58.173
126

高等院校选用教材

生物化学与分子生物学原理

(修订版)

王联结 主编

王联结 熊正英 王喆之 编著

科学出版社

北京

27848

内 容 简 介

本书作者根据自己16年的研究生入学考试辅导经验,围绕着为考研服务的原则,对生物化学和分子生物学的基本原理、基本概念和研究方法进行了归纳和总结。本书内容言简意赅、层次分明、针对性强。

本书适合于高等院校生命科学、医学、农学各专业报考硕士研究生的本科生学习和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学原理/王联结主编. —北京:科学出版社,1999.6
(高等院校选用教材)

ISBN 7-03-007185-9

I. 生… II. 王… III. ①生物化学 ②分子生物学 IV. Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第38349号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1999年6月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2004年3月第四次印刷 印张: 14 3/4

印数: 8 001—10 000 字数: 282 000

定价: 20.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

再版序言

应科学出版社的要求，花费了两个月时间对原书进行了补充修改。仍然坚持写第一版时的初衷，面对已学过生物化学及分子生物学的大学生，手头无疑有用过的生物化学及分子生物学教科书，甚至也因报考研究生或自己想多自学一些而增添了其他版本的教科书，没有必要让图表占去相当的篇幅和因此增加读者考研的经济负担，所以增加的内容均是在第一版之后新出现的或原来漏掉的知识。对没有说清楚或不甚准确的内容进行了修改，对一些读者认为比较绕口的词句重新说明。附录仅增加了一所工科大学生物工程专业生物化学习题和解答。当初增加习题附录，目的是要让大家对习题类型有所了解，不主张以题海战术解决问题，还是要从多读、细读教材下功夫。编写此书正是要帮助读者做到读好、读懂教材。

感谢过去两年读者的厚爱，庆幸科学出版社的欣然选择和认真的编辑发行，此书第一版两年内已经重印了一次，现在又要再版。在此谨作为一个讲授生物化学 20 余年的大学老师祝愿千万学子报考研究生成功，衷心期盼收到你们读后的体会和珍贵的意见。

作者

2001 年 4 月 20 日

前 言

生物化学是生物学、医学、农林、食品等学科的基础课或专业基础课，集中反映了分子生物学的进展。随着相关学科从各个方面研究的不断深入，生物化学内容每10年几乎翻一番，由于生物化学内容愈来愈多，真正全面系统地掌握生物化学知识是一件令学习这门课程的学生非常头疼的事。如何在有限的时间内，较好地学习好这门课程，满足本科生的基本要求，特别是在学习完本科生物化学教材内容之后，进一步理顺全部内容，掌握其中的重点，领会其中的基本原理、基本概念、基本规律和基本研究方法，进而满足报考研究生的需要，一直是本科生特别是报考研究生的学生迫切需要解决的问题。本书是作者集十余年辅导报考研究生的本科生复习生物化学的体会和经验，在对报考全国重点大学，包括综合大学、农林、轻工、医学和师范院校有关专业研究生的学生的生物化学考试成绩跟踪分析和研究之后撰写而成的，有很强的针对性和实用性。

本书以高等教育出版社出版的沈同教授等编写的《生物化学》（以下简称为教材）为基础，覆盖了医学、农林和食品等专业生物化学教材内容，同时包括了分子生物学的基本内容，报考各类专业的生物化学考试的学生均可阅读。

本书的前三章包括了生物化学最基本的知识要点，目的在于使读者对生物化学和分子生物学有一个总体了解。后面各章重点放在核酸、蛋白质（包括各种功能蛋白质）和生物膜上。本书对生物化学习题分别做了讨论，对学好生物化学的方法也做了介绍。

本书面向已经学习完本科生物化学及分子生物学的学生，包括的内容在教科书中已经接触过，为了在复习过程中唤起读者的注意，体现出各部分内容的重点，便于复习使用，对教科书各章节的顺序进行了调整和重组。例如有关蛋白质和核酸的内容仅各用一章来完成，以便学生对蛋白质和核酸的知识有一个系统的学习。对于那些在教科书中多用图表说明的内容，尽可能直接叙述，因为考试时这些内容主要是要用文字而非图表来回答的。实践中发现不少学生往往疏忽了这一转化过程，翻开教科书时能理解这些图表，但要用文字叙述时则丢三忘四。另外，对于每一个重要的知识点，尽可能用简单明确、层次分明的叙述来完成。考虑到生物化学与分子生物学发展迅速，本书对最新的和已基本肯定的知识也做了介绍，供读者参考。所以，本书中多数知识点的叙述自成体系，是一本有问有答的习题集。本书中的总结和归纳多些，而图表几乎没有，使用时难免要返回去翻阅教科书，促使学生多读几遍教科书，从而减少自划重点、人为遗漏的现象。一

本再好的参考书，终究不能替代教科书，建议使用本书的读者应首先认真阅读教材，然后耐心读完本书，并认真完成提供的试题，之后再阅读一遍教材。

对于今后仍要继续研究的内容，书中给予明确说明，目的在于让学生知道这些知识的生长点。挑选出的硕士研究生生物化学及分子生物学入学考试试题，基本上已包含了各方面的内容，体现了目前生物化学与分子生物学的知识重点，如果反复阅读了教材，理解了本书中强调的知识，能自如地完成这几份试题，生物化学与分子生物学硕士研究生生物化学考试的基本应试能力应当是具备了。

用这样的方法写成此书是一种尝试，不仅要满足报考硕士研究生读者的要求，而且要供教学和进一步自修参考，其难度可想而知。书中如有不妥之处请读者随时批评指正，衷心欢迎每一位使用本书的读者及时反映自己的见解，以利今后再版时修改。

本书的资料主要来自接受辅导的 16 届考研学生。如果没有辅导这些学生考研的机会，根本谈不上完成此书，在此应当向这些学生（他们中许多人已是博士、硕士、副教授）表示感谢。在撰写这本书时，一些即将和正在攻读硕士学位的学生对书稿提出了许多宝贵的建议，再次表示感谢。

中国科学院生物物理研究所王志新院士、北京大学生命科学院朱圣庚教授、北京医科大学生物化学与分子生物学系童坦君教授等对完成本书给予了热情指导。山西师范大学赵景荣、刘维仲、宋贵生同志在文字校对中付出了辛勤劳动，科学出版社科学出版中心李锋主任、责任编辑姚坚毅同志对本书的问世给予了热情帮助和支持，作者均致以衷心感谢。

目 录

再版序言

前言

第一章 生命物质的特点	1
1.1 生命物质的元素组成特点	1
1.1.1 生命元素	1
1.1.2 动物生命元素特点	1
1.1.3 植物生命元素特点	2
1.1.4 核酸、蛋白质的元素组成与定量分析	3
1.2 生命物质分子组成特点	5
1.2.1 构件分子	5
1.2.2 多糖的构件分子特点	5
1.2.3 脂类构件分子的特点	6
1.2.4 蛋白质构件分子的特点	6
1.2.5 核酸构件分子的特点	7
1.2.6 生命物质构件分子的共同来源	8
1.3 生物大分子结构与功能特点	8
1.3.1 主干链的单调重复性	8
1.3.2 支链的多变性	8
1.3.3 构象和异构	9
1.4 生命物质作为信息分子的基础	9
1.5 生物大分子结构的主次性	10
1.6 生物大分子自身功能的主次性	10
第二章 生命物质代谢的特点	12
2.1 降解的特点与方式	12
2.1.1 生命物质的降解特点	12
2.1.2 生命物质降解的方式	12
2.2 生物大分子的分解	13
2.2.1 生命物质分解的特点	13
2.2.2 生命物质分解的作用	13
2.3 生命物质合成的特点	13

2.4	生命物质代谢的条件	14
2.5	生命物质代谢之间的互补性	14
2.6	生命物质代谢的活化方式特点	15
2.7	生物化学反应的可逆性	16
第三章	生物化学的基本内容	18
3.1	氧化还原	18
3.1.1	生命物质的两性解离	18
3.1.2	生物电	18
3.1.3	酶作用的机理	18
3.1.4	别构效应	19
3.1.5	能量转化	19
3.1.6	生物固氮和硝酸盐的同化	19
3.1.7	碳的同化	19
3.1.8	体液 pH	20
3.2	构象异构原理	20
3.2.1	生物大分子是“弹性分子”	20
3.2.2	酶活性的别构调节	20
3.2.3	生物大分子的识别能力	21
3.2.4	生命过程能量转换的研究与构象异构	21
3.2.5	朊病毒与构象异构	21
3.3	平衡原理	22
3.3.1	氮平衡	22
3.3.2	碳平衡	22
3.3.3	能量平衡	22
3.3.4	水平衡	22
3.3.5	酸碱平衡	23
3.4	循环原理	23
第四章	蛋白质生物化学	24
4.1	肽和蛋白质的全水解及氨基酸组分测定	25
4.2	多肽或蛋白质的氨基酸序列测定	25
4.3	蛋白质的二级结构	27
4.4	蛋白质的超二级结构	28
4.5	蛋白质的三、四级结构	29
4.6	蛋白质的构象运动	30
4.7	氨基酸代谢	32

4.7.1	氨基酸的脱氨基、转氨基及氨的去路	33
4.7.2	碳骨架的分解	35
4.7.3	氨基酸代谢缺陷症	36
4.7.4	氨基酸的生物合成	36
4.8	蛋白质生物合成	37
4.8.1	核糖体	37
4.8.2	tRNA	39
4.8.3	mRNA	40
4.8.4	起始因子	41
4.8.5	延伸因子	41
4.8.6	终止因子	41
4.8.7	蛋白质生物合成的步骤	42
4.8.8	翻译后加工	43
4.8.9	蛋白质的转运	44
4.8.10	寡肽的生物合成	44
4.8.11	蛋白质折叠	45
4.9	酶	49
4.9.1	酶的作用特点	49
4.9.2	酶的结构特点	49
4.9.3	酶促反应的动力学	50
4.9.4	抑制剂作用动力学	53
4.9.5	pH 和温度对酶促反应速度的影响	54
4.9.6	酶活力的表示	54
4.9.7	酶的提取	55
4.9.8	维生素和辅酶	55
4.10	食用蛋白	56
4.10.1	肉类蛋白	56
4.10.2	乳蛋白	56
4.10.3	种子蛋白	57
4.10.4	单细胞蛋白	57
4.10.5	禽蛋蛋白质	57
4.11	毒蛋白与毒肽	57
4.12	多肽生长因子	58
第五章	核酸生物化学	60
5.1	核酸的降解	60

5.2	核酸的测序	62
5.2.1	染色体步行和染色体跳跃	63
5.2.2	物理图谱	64
5.2.3	DNA 测序技术	65
5.2.4	核酸一级结构与遗传信息	66
5.3	基因组特点	67
5.3.1	原核生物基因组特点	67
5.3.2	真核生物基因组特点	67
5.4	质粒 DNA 特点	67
5.5	以 RNA 为遗传信息载体的基因结构特点	68
5.6	重要概念	69
5.6.1	基因组、染色体外遗传因子	69
5.6.2	转录单元、多顺反子、操纵子、调节单元	70
5.6.3	重叠基因、重复序列、卫星 DNA	70
5.6.4	不连续基因、内含子、外显子、介入顺序	70
5.6.5	假基因、转位因子、插入顺序	71
5.6.6	基因家族、重复顺序	71
5.7	核酸二级结构	72
5.8	DNA 的构象异构	73
5.9	核酸一级结构与种属差异	73
5.9.1	DNA 链的长度、数目与 C 值矛盾	74
5.9.2	嘧啶和嘌呤类核苷酸分布的不均一性	74
5.9.3	相邻核苷酸顺序的差异	74
5.9.4	反向重复序列	75
5.9.5	Cot 值与基因组大小	75
5.9.6	编码蛋白质、tRNA、rRNA 的序列和非编码序列的特点	76
5.10	核苷酸代谢	76
5.10.1	核苷酸的分解代谢	76
5.10.2	核苷酸的生物合成	76
5.11	DNA 的生物合成	77
5.11.1	DNA 的半保留复制	77
5.11.2	复制的起点与方向和速度	78
5.11.3	DNA 复制酶类和蛋白质	79
5.12	DNA 损伤、突变、人工诱变、癌变	80
5.13	基因重组的原理	83

5.13.1 遗传重组	83
5.13.2 细菌的重组	84
5.13.3 DNA重组	85
5.14 RNA的生物合成	93
5.15 转化、转染、转导、转基因	98
5.16 PCR技术	98
5.17 生物工程、基因工程、细胞与组织工程、生物制药	99
5.18 生物芯片	100
第六章 糖代谢	101
6.1 糖类的水解和裂解	101
6.2 糖的分解特点	102
6.3 糖的分解途径	102
6.3.1 糖酵解	102
6.3.2 三羧酸循环	104
6.3.3 磷酸戊糖途径	106
6.3.4 乙醛酸循环	106
6.4 糖的合成代谢特点	107
6.4.1 三碳循环(卡尔文循环)	107
6.4.2 四碳途径	107
6.4.3 糖原的合成	107
第七章 脂类代谢	109
7.1 脂类的消化吸收与转运	109
7.2 脂肪酸的分解	110
7.3 脂肪酸的合成	110
7.4 甘油三酯和磷脂的合成	111
7.5 胆固醇的代谢	112
第八章 生物膜与生物氧化	113
8.1 生物膜	113
8.2 生物氧化	113
8.2.1 生物氧化的物理化学基础	114
8.2.2 线粒体的结构——生物氧化的细胞学基础	114
8.2.3 氧化磷酸化要点	114
第九章 代谢调节	116
9.1 代谢调节的方式和水平	116
9.2 酶水平的调节	116

9.2.1	酶量的调节	116
9.2.2	原核生物基因表达的调节	117
9.2.3	真核生物基因表达调控	121
9.3	激素调节	122
9.3.1	生物信息	122
9.3.2	G 蛋白	123
9.3.3	甾体激素受体超家族	124
9.3.4	第二信使的生物学功能	124
9.3.5	磷酸化与脱磷酸化	125
9.4	癌变与代谢调节	125
9.4.1	癌基因	125
9.4.2	癌基因的表达产物	126
9.4.3	抑癌基因	126
9.5	蛋白质与 DNA 的相互作用	126
9.6	生物大分子结构数据库与生物信息学	127
9.6.1	生物大分子结构数据库	127
9.6.2	生物大分子结构数据库的作用	128
9.6.3	生物信息学	128
第十章	习题类型与解答要点	129
10.1	计算题	129
10.1.1	pH 和 pI 的计算	129
10.1.2	静电荷计算	130
10.1.3	肽和蛋白质的多样性	131
10.1.4	序列测定	132
10.1.5	同位素在生物化学与分子生物学中的应用	134
10.1.6	图表分析	136
10.2	基础知识	138
10.2.1	结构式的书写	138
10.2.2	辨认结构式	139
10.2.3	化学反应式	141
10.2.4	基本事实(一句话, 是什么是什么)	142
10.2.5	基本概念(什么叫什么)	150
10.3	回答或简答	156
10.4	论述题	157
10.5	实验设计问题	158

附录	160
部分院校、研究所硕士研究生入学考试生物化学试题.....	160
中国科学院一九九三年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)	160
中国科学院一九九四年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)	164
北京大学一九九一年研究生入学考试试题.....	168
北京大学一九九二年研究生入学考试试题.....	172
北京医科大学一九九三年招收硕士研究生试题.....	175
北京医科大学一九九四年招收硕士研究生试题.....	179
北京师范大学一九九五年攻读硕士学位研究生入学考试试题.....	183
北京师范大学一九九六年攻读硕士学位研究生入学考试试题.....	185
南开大学一九九六年研究生入学考试试题.....	187
首都师范大学一九九六年研究生入学试题.....	189
华东理工大学 2000 年硕士研究生入学考试试题	190
参考答案	193
中国科学院一九九三年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)	193
中国科学院一九九四年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)	195
北京大学一九九一年研究生入学考试试题.....	197
北京大学一九九二年研究生入学考试试题.....	200
北京医科大学一九九三年招收硕士研究生试题.....	203
北京医科大学一九九四年招收硕士研究生试题.....	205
北京师范大学一九九五年攻读硕士学位研究生入学考试试题.....	208
北京师范大学一九九六年攻读硕士学位研究生入学考试试题.....	211
南开大学一九九六年研究生入学考试试题.....	213
首都师范大学一九九六年研究生入学试题.....	216
华东理工大学 2000 年硕士研究生入学考试试题	218
参考文献	221

第一章 生命物质的特点

1.1 生命物质的元素组成特点

1.1.1 生命元素

组成生物体的物质除了水和无机盐以外就是有机物，包括蛋白质、核酸、糖、脂类等，这些有机物习惯上也被称为生命物质。生命物质中常见的元素一般认为有 22 种，包括碳、氢、氧、氮、磷、硫 6 种主要元素和 16 种其他元素，其中钙、磷、钾、钠、氯、镁为常量元素，铁、碘、锌、锰、钴、钼、铜、硒、铬、氟为微量元素。6 种主要元素是蛋白质、核酸、糖和脂的主要组成元素，所以又被称为生物有机元素。22 种元素中的金属元素被称为生物金属，其中钾、钠、钙、镁为主要生物金属。

在门捷列夫元素周期表中，22 种生命元素的分布集中在 3 个部分：10 种生命金属分布在两个部分，组成两个“岛”；氢和碘以外的非金属生命元素集中分布在另一个“岛”；氢、碘和钼以外的生命元素属于 1~4 周期，大部分生物金属元素分布在第 4 周期。

在 22 种生命元素中，相对于最稳定的电子构型而言，氮、硫和磷有着可变的氧化数，氮和氧有着较强的电负性，这两种特性与生命物质的许多关键作用密切相关。

生物体中的大多数金属元素只有和各自的配体结合后才表现生物活性。这些配体有小分子配体和大分子配体两类。小分子配体如氨基酸、核苷酸、 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} ，大分子配体如蛋白质、核酸等。生物大分子配体与金属离子的反应是生物无机化学研究的主要内容之一。

1.1.2 动物生命元素特点

在动物体中，22 种生命元素的含量和作用可以通过体液的电解质平衡研究获得认识。体液的渗透压和 pH 的维持与电解质平衡密切相关。

Na^+ 、 Cl^- 是维持细胞外液容量和渗透压的主要离子，达到维系渗透压总离子的 80% 左右。 Cl^- 与 HCO_3^- 是细胞外液主要的阴离子， Cl^- 在体内参与胃酸的合成，人血浆中 Na^+ 和 Cl^- 浓度分别为 326.0mg/ml 和 365.7mg/ml。

动物的消化液包括唾液、胃液、肠液、胆汁等，所含电解质浓度和血浆相似，但胃液主要阳离子为 H^+ ，消化液中含有催化水解过程的金属酶类，锌、镁、钙及锰是它们的辅基。

动物的骨成分中有氟存在，可保护牙齿。但过量氟对动物是有毒的。

在防治克山病研究中，人们发现了硒是保护机体健康必需的微量元素，谷胱甘肽过氧化物酶、磷酸过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶中含有硒。已确定，硒半胱氨酸是在翻译时掺入到肽链中去的，携带有 L-丝氨酸的 tRNA 在两种酶作用下使 L-丝氨酸转变为硒半胱氨酸，然后在翻译时进入肽链，对应的密码子是 UGA。UGA 一般情况下是终止码。

1.1.3 植物生命元素特点

植物生命元素的组成主要包括 16 种。其余 13 种需要极微。在 16 种必需元素中，不同于动物必需的元素之处在于缺少钠和碘而有硼，在进行溶液培养法栽培植物时，很少考虑钠的需求，生长在海洋中的一些植物需要碘。这种差别并不反映在植物体中化学元素的含量分析上，有些植物生长并非必需的元素可以在体内大量积累，例如钠可占植物干重的 0.02%。但这一含量远不足以满足动物对钠的需求。动物主要以食盐获得所需的钠。

植物生长最需要的元素是氮、磷和钾。氮来自无机氮，磷来自正磷酸。光合作用中，除了光照、水和 CO_2 ，氮和磷自然是最需要的，钾参与运输光合产物和植物呼吸。

硼是植物所需的必需元素中发现最早的微量元素，与细胞分化、光合作用等多种过程有关。

比较动物和植物生命元素，有以下几个方面需要特别注意：

(1) 钠在动植物中的作用大同小异。动物有消化道，有血液，有专一的循环和泌尿系统，有维持 pH 和渗透压稳定的整套体系。钠有进有出，维持平衡。而植物没有动物这样的结构，采取了以拒之体外为主的方式。看起来钠在动植物中的分布截然不同，但从钠在细胞外分布为主、主要以无机盐形式存在、主要与膜电位形成有关三方面来看，钠在动物和植物的分布和作用是一样的。

(2) 钾、钙、镁、锌、铜、铁、钼、锰等 10 种生物金属在动植物体中的存在方式和作用基本相同。钾在动植物体均为细胞内离子，与膜电位的形成关系密切。锌、镁、钙和锰通常作为催化水解过程的金属酶的辅基。锌、铁、钼、铜通常是氧化-还原酶的辅基。镁、锰通常是各种激酶的辅基。因此，如果我们同时考虑到碳、氢、氧、氮、磷、硫等有机物组成的共同元素，动物和植物的生命元素组成的差别是很小的。

动物和植物的元素组成差别是如此之小，微生物的元素组成又能有什么特别之处呢？认识到这些之后，我们自然应当多重视动物、植物和微生物怎样获得生命元素以及各种生命元素如何发挥作用。

(3) Ca^{2+} 的第三信使作用。在所有的生命元素中， Ca^{2+} 的作用最为广泛，不仅是骨骼的成分，更重要的是调节物质， Ca^{2+} 参加几乎所有的代谢调节。

(4) 磷。生物体各种有机质代谢时活化方式都与磷酸化-脱磷酸相关。酶活性调节、基因调控也与磷有关。“磷是生命活动的中心”得到了广泛支持。

(5) 各种生命元素中， Na^+ 和 K^+ 成对相互作用，典型的例子是 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵。细胞以摄 K^+ 排 Na^+ 的方式消耗 ATP，进而使膜蛋白成为“分子马达”在膜上旋转，为揭开生物大分子整体运动的秘密打开了缺口。

(6) 铂与抗癌。顺铂的抗癌机理一直受到关注，其产品走向了临床。由此初步说明了生物大分子配体与金属元素结合之后金属元素自身的作用机理。金属离子有维系生物大分子空间结构的能力，也有破坏、抑制生物大分子原有空间结构的能力。

(7) 金属离子和配体结合的必要性，许多金属离子，如铁、镁、铜、铬游离存在时对人都是有毒的，但和一定的配体结合后，不仅易于转运，而且毒性下降。生物有一套复杂的方法来选择利用各种金属离子。

研究生命物质的元素具有重要的理论价值。在分子生物学全面深入发展的今天，元素分析不仅仅是了解生物体的化学组成问题，更重要的是为探讨生命物质担负生命活动的机理开辟了新途径。专门研究生命金属元素作用机理形成了生物无机化学，专门研究生命非金属元素与生命活动关系形成了生物有机化学，生命物质已被划分为多个水平、多个层次、多个角度进行研究。已有事实表明，生命科学研究在历经近半个世纪的以核酸和蛋白质为核心的研究之后，即使是在人类基因组计划实现之后，还不能说生命科学真正进入了分子水平，因为生物体中各种物质的组成和作用的全貌还有待进一步认识。

1.1.4 核酸、蛋白质的元素组成与定量分析

核酸分子中，无论是 DNA 还是 RNA，主链结构单一，呈现磷酸-核糖（脱氧核糖）的重复。由此人们通过测定核酸分子中磷的含量便可基本确定核酸的含量，进而求出摩尔磷消光系数 $\epsilon(P)$ ，来表示溶液中核酸含量。

$$\epsilon(P) = \frac{A}{CL}$$

其中 A 为紫外吸收光密度值，C 为每升溶液中磷的摩尔数，L 为比色杯内径，由于

$$C = \frac{\text{每升溶液中磷的重量 } W \text{ (g)}}{\text{磷的原子量 (30.98)}}$$

上式可写成

$$\epsilon(P) = \frac{30.98A}{WL}$$

一般 DNA 的 $\epsilon(P)$ 为 6000~8000, RNA 为 7000~10000。由于双链中氢键存在,使核苷酸中的共轭双键的紫外吸收减弱, $\epsilon(P)$ 值降低, DNA 变性时,双链解开, $\epsilon(P)$ 值又升高,这一现象称为减色效应和增色效应,广泛用于核酸变性复性研究。

在实际含量测定时,核酸样品的纯度采用下式计算:

$$\text{DNA (或 RNA)} = \frac{\frac{\text{甲}_{0.0260} - \text{乙}_{0.0260}}{0.020 \text{ (或 } 0.022)} (\mu\text{g/ml})}{\text{样品浓度 } (\mu\text{g/ml})} \times 100$$

$$\text{样品浓度} = \frac{\text{样品重量}}{\text{总样品体积 (最后稀释)}}$$

上式中 0.020 和 0.022 分别为 1 $\mu\text{g/ml}$ DNA 溶液和 RNA 溶液的消光值,它们通过下式来求得:

$$\frac{6000 \times 30.98}{\frac{0.092}{109}} = 0.020 \text{ (DNA)}$$

其中 6000 为 DNA 的 $\epsilon(P)$, 30.98 为磷的原子量, 0.092 为 DNA 分子的一般含磷量。甲_{0.0260}和乙_{0.0260}分别代表样品和对照(空白)的消光值。这样做是为了消除杂质的干扰。

通过测定含磷量来测定核酸含量的方法广泛应用于工业分析。在科研工作中,常常遇到的是重复测定同一样品,为了减少计算的麻烦,可采用分光光度法最基本的方法——标准曲线法。通过含磷量可以对核酸的纯度进行初步判定。

在蛋白质的分子中,主干链呈现“C—C—N”的重复,20种常见氨基酸中仅有3种含有 α -氨基以外的氨基,所以可以用含氮量来求得蛋白质含量。酿造工业、饲料工业中普遍采用克氏定氮法测定蛋白质含氮量。由于蛋白质含氮量常为16%,按下式即可求出蛋白质含量:

$$\text{每克蛋白样品中含氮量 (g)} \times 6.25 = \text{每克样品中蛋白质含量 (g)}$$

式中 $6.25 = 100/16$ 。

在蛋白质分子中,微量元素(如铁、碘)或某一种含量特少的氨基酸(如色氨酸)等可用来测定蛋白质的分子量而非含量。由此直接求出的仅仅是最低分子量的近似值,而且需要其他物理化学方法相配合。例如,在肌红蛋白中,铁的含量为0.335%,则肌红蛋白最低分子量为

$$\text{最低分子量} = \frac{\text{铁的原子量}}{\text{铁的百分含量}} \times 100 = \frac{55.8}{0.335} \times 100 = 16700$$

这个值近似于渗透压法测知的值。用渗透压法测知血红蛋白的分子量是这个值的4倍，说明血红蛋白有4个铁原子，由4条链组成。

最低分子量的方法在利用放射性同位素测定蛋白质和酶的分子量时进一步得到应用。

1.2 生命物质分子组成特点

1.2.1 构件分子

蛋白质主要是由20种氨基酸通过肽键和二硫键相连而成。核酸主要是由5种核苷酸经酯键聚合而成。多糖是单糖通过 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键或 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键组成的聚合物。脂主要是由甘油同脂肪酸等结合而成。

通常把生物大分子的基本分子组成单位，如氨基酸、核苷酸等叫做构件分子。由构件分子聚合而成是生物大分子的共同特点。

生物大分子组成的另一个特点是：蛋白质、核酸和多糖伸展后均成链状，脂类呈片状。

生命大分子中的构件分子普遍具有可修饰性。例如氨基酸残基的磷酸化、糖基化、脂化，核苷酸残基碱基上的氨基化、甲基化等。由此导致生物大分子生物合成时所需的构件分子种类数往往大于这些大分子水解后获得的构件分子数。因此，存在于蛋白质分子中的氨基酸种类数往往不等于20种。

必须注意到，生物体内的另外一类生物大分子——萜类化合物，如胆固醇，常见的植物挥发油类，天然橡胶，维生素A、E、K和D等都是异戊二烯的聚合物，但这种划分主要是对这些大分子的碳原子个数及生物合成时具有共同的中间体而言的，不能在生物体内得到异戊二烯单体这样的水解产物。

1.2.2 多糖的构件分子特点

多糖由单糖分子缩合而成。单糖有丙糖、丁糖、戊糖、己糖及庚糖，生物体中这几类单糖都存在，多于7个碳原子的单糖未见报道。在已知的这几类单糖中，能形成多糖的主要是己糖，其次是戊糖。一般而言，动物、植物、微生物体中的多糖几乎都是己糖或己糖衍生物的聚合物，如糖原、淀粉、纤维素、几丁质、菊糖、琼脂、透明质酸、硫酸软骨素、肝素等。多糖中的葡萄糖以 α -D或 β -D两种构型出现，且均为右旋(+)，自然界存在的糖几乎都是D型的，担负糖

储存作用的多糖以 α (1 \rightarrow 4) 和 β (1 \rightarrow 6) 糖苷键结合, 纤维素和壳多糖是以 β (1 \rightarrow 4) 糖苷键相连而成的。

1.2.3 脂类构件分子的特点

甘油和脂肪酸是各种脂类化合物的共同组分, 形成的甘油三酯、磷脂和肌醇磷脂通过疏水作用并列在一起, 其间夹杂着蛋白质和糖类化合物。各种脂类分子的差异在于甘油分子上三个羟基结合的脂肪酸的种类及是否另有其他非脂肪酸组分。

1.2.4 蛋白质构件分子的特点

受遗传密码支配的氨基酸共有 20 种。为什么仅有 20 种氨基酸为蛋白质生物合成所需, 至今尚无解释。除甘氨酸外, 其余 19 种氨基酸均为手性分子, 且均为 L 型。苏氨酸和异亮氨酸另有一个不对称碳原子。细菌体内可有少数 D 型氨基酸, 生物为什么选用 L 型氨基酸至今尚无满意解释。除脯氨酸外, 其余 19 种氨基酸均为 α -氨基酸, 脯氨酸为亚氨基酸。

氨基酸可同时带有正负两种电荷, 这种两性解离的性质为 20 种氨基酸所共有, 共同赋予蛋白质的两性解离特性。氨基酸的两性解离性质是氨基酸和蛋白质最主要的化学性质。深刻理解这一性质, 熟练运用这一性质, 是分离、纯化氨基酸和蛋白质, 进而理解核酸性质, 理解生命物质的半导性、生物电、生物大分子之间相互作用、酶作用的机理、别构效应, 特别是生物大分子的折叠和去折叠等生物学基本理论的基础。

在生物化学和分子生物学的学习过程中, 需要牢固记忆 20 种氨基酸、5 种核苷酸、常见的单糖和有机酸结构式。这些结构式及其固定英文字符如同学英语要熟悉 26 个字母一样重要, 因为它们在任意章节的内容中要反复大量地出现和使用。那种用汉字代替这些结构式的做法万万不可取。

20 种氨基酸的英文符号有三字符和单字符两种, 前者取其英文名称的前 3 个字母, 比较容易记忆, 而后者记忆起来较难, 因为其中 9 种氨基酸的单字符并非它们的首字母。仔细分析, 其实也有规律, 这些氨基酸恰好是 2 种酸性氨基酸 (天冬氨酸 D、谷氨酸 E) 和它们的酰胺 (天冬酰胺 N、谷氨酰胺 Q)、2 种碱性氨基酸 (赖氨酸 K、精氨酸 R) 及 3 种芳香族氨基酸 (苯丙氨酸 F、酪氨酸 Y 和色氨酸 W), 知道了这一点, 记忆起来也就容易多了。另外, 蛋白质水解时酰胺容易水解丢掉氨基成为相应的氨基酸, 与蛋白质原有的相应氨基酸混在一起, 为此以单字符 B 代表天冬氨酸和天冬酰胺的总和, 以单字符 Z 代表谷氨酸和谷氨酰

胺的总和。

除上述受遗传密码支配的 20 种氨基酸外，4-羟脯氨酸、5-羟赖氨酸、锁链素、瓜氨酸和鸟氨酸的结构式也要记清。前 3 者主要见于胶原蛋白和弹性蛋白，是肽链之间共价交联的另一种方式，瓜氨酸和鸟氨酸见于尿素循环。

20 种氨基酸的分类问题不可忽视，常见的分类方法有两种：一种是根据结构划分为脂肪族、芳香族和杂环族，这种方法有利于记忆结构式；另一种是根据氨基酸在生理 pH 条件下的解离划分为非极性、带正电、带负电和不带电 4 类，这种方法有利于理解蛋白质空间结构的形成。但是，近年来蛋白质空间结构，特别是二级结构预测的研究，使得上述划分面临更新。因为蛋白质二级结构形成与氨基酸排列顺序的关系初步表明，20 种氨基酸有可能来自遗传信息调控的分类，究竟怎样划分为好有待进一步研究。

在 20 种氨基酸中，组氨酸既可以是酸，又可以是碱，具有得电子和失电子两种能力；天冬氨酸和谷氨酸多余一个羧基；苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸 R 基中有一羟基，这些特点使得它们经常处于机能物质如酶的活性中心。

3 种芳香族氨基酸赋予蛋白质紫外吸收的能力，含有这些氨基酸的蛋白质可在 280nm 处进行定量检测。这 3 种氨基酸都有一个苯环。

食品工业和制药工业等经常要检测色氨酸和赖氨酸的含量，因为二者均为人类不能合成的氨基酸，部分农作物如玉米种子中含量较少，胶原蛋白不含有色氨酸。迄今为止，测定蛋白质中某种氨基酸的含量，一般采用完全水解，再经层析如气相色谱技术分离，然后用茚三酮反应定量。也可用分光光度法直接测定。

1.2.5 核酸构件分子的特点

核酸有 DNA 和 RNA 两大类，均为核苷酸的聚合物，组成核酸的核苷酸均为 5'-核苷酸，即磷酸基在核糖 5'-碳原子上；核酸中的核苷酸残基均以由前一个核苷酸的 3'-OH 和后一个核苷酸的 5'-磷酸基脱去一分子水而成的 3', 5'-磷酸二酯键相连。自然界核酸分子中的核糖均呈 β -D 型，核酸分子的糖苷键均为 β -糖苷键（和纤维素中糖苷键类型相同）。但在生物合成核苷酸时，核糖以 α -D 型进入反应（2'-脱氧核糖是在二核苷水平上形成的）。

DNA 的核苷酸有 4 种，RNA 的核苷酸主要有 4 种，DNA 和 RNA 的构件分子差别主要在于前者为脱氧核糖及以 dTMP 代替了 UMP。

为什么核酸的构件分子选用 5'-核苷酸？为什么两类核酸通常仅以 4 种核苷酸聚合而成？DNA 为什么选用脱氧核糖？为什么自然界核酸分子中的核糖为 β 型，而合成时需 α 型？这些问题有待研究。

随着蛋白质二级结构预测研究的深入，人们越来越关注 4 种核苷酸和 20 种

氨基酸之间的关系，到底是 4 决定了 20，还是 20 决定了 4？二者之间是否存在一种数控机理？在计算机应用日益普及和深入的今天，已经能够用数学方法仔细研究这些问题，但关键是选择一个突破口，基本的思路首先应当实现遗传信息传递的数字化。

1.2.6 生命物质构件分子的共同来源

地球可分为 4 部分：大气圈、水圈、生物圈和岩石圈。 N_2 、 O_2 、 CO_2 和水蒸气组成大气圈；海洋、湖泊、河流、冰川等组成水圈，占地球表面总水量 98% 以上的海水是水圈的主体，大量的无机物存在于水圈中；地球的固体部分是岩石圈，包括土壤、地壳、地幔，岩石圈由盐类组成；生物圈是地球上动物和人类居住的地方，包括地面上下 100~200 米的范围，生物圈周围的组成是无机的。氮、碳、氢、氧等构成大气成分的元素在大气圈、岩石圈、水圈、生物圈之间循环；而金属元素中的大多数则主要在岩石圈、水圈、生物圈之间循环。生物体中的氮、碳、氢、氧主要从大气圈和水圈获得；其余的非金属元素主要从水圈、岩石圈获得。前者经光合作用主要以糖的形式固定下来，后者则靠植物的根部和土壤的接触、微生物同土壤的接触、水圈中的生物同水接触并伴随着糖的转化而以无机的和有机的形式固定下来。因此，水、二氧化碳、氮气、氢气、氧气以及各种无机盐是生命物质的根本来源，也是生命物质彻底分解的产物。

1.3 生物大分子结构与功能特点

1.3.1 主干链的单调重复性

多糖、蛋白质和核酸的主干链分别是“糖环重复”、“C—C—N”重复和“磷酸—核糖（或脱氧核糖）”重复。脂类形成的生物膜结构铺展开后，亲水区或疏水区所呈现的也是一种重复结构。生物大分子主干链的重复性是生物大分子稳定性的基础，有了这种基础，核酸中碱基种类和排列顺序的变化才成为可能，蛋白质分子中氨基酸残基 R 基的变化、多糖分子中糖环上的修饰变化才有意义。这是自然界“变化中有不变，不变中有变化”的辩证关系的体现。

1.3.2 支链的多变性

组成蛋白质的 20 种氨基酸的彼此差别在于 R 基的不同，自然界蛋白质的种类差异就在于每种氨基酸的含量和它们排列的顺序不同。同理，核酸分子中每种

碱基的含量和顺序的差异决定着核酸的种类。多糖分子中糖环的修饰、磷脂分子中脂肪酸的种类差别和磷酸基上取代基的变化也是各种多糖和磷脂的差异之处，但与核酸和蛋白质相比，多糖和磷脂种类差异的规律性差一些。正是由于这个原因，长期以来，人们几乎很少将多糖和磷脂看作是信息载体分子，直到近几年，多糖分子的信息载体作用才受到重视。

1.3.3 构象和异构

生物大分子一般有很长的链，除具有碳链异构、顺反异构、差向异构、官能团异构、旋光异构等异构现象外，另外两种构象异构与生命活动关系最为密切。

除脂类以外，多糖、蛋白质、核酸都具有螺旋式的构象，其中蛋白质和核酸的螺旋方式研究得较多。蛋白质的构象异构集中体现在别构现象，现已证实，不仅具有四级结构的蛋白质有别构现象，许多仅有一条肽链的蛋白质也有别构现象。载体蛋白、抗体、酶和运动蛋白等的作用机理，通过别构现象研究得到了很好地解释。

核酸的构象研究充分表现在超螺旋结构与拓扑异构方面。具有相同一级结构，但两链相互缠绕次数不同的两个环形或线形 DNA 即拓扑异构体。拓扑异构是双链 DNA 分子特有的构象异构。

蛋白质的别构和 DNA 分子的拓扑异构的发现，使生命物质有了“弹性”，生命运动的自主性肯定是建立在生命物质能动性之上的。面对类似蛋白质和核酸这样的大分子，以前人们自然认为这些分子“僵硬”的一面要多一些，现在有了蛋白质和 DNA 分子构象变化的两种新方式的事实，生命物质是动态分子的观点已被人们普遍接受。

1.4 生命物质作为信息分子的基础

作为信息分子，首先应当能够携带信息、体现信息，其次是能传递和表达这些信息。DNA 分子的碱基顺序是携带遗传信息的基础，碱基配对是传递和表达遗传信息的基础。过去很长时间把蛋白质当做遗传信息传递的终端，随着蛋白质工程的出现，遗传信息的传递可以逆转。根据已知的蛋白质结构，合成 mRNA，反转录成 cDNA，再经 DNA 重组，实现了这种逆转，因此，蛋白质分子也可以看作是遗传信息的携带者。在蛋白质、RNA 和 DNA 之间，遗传信息能以不同的方式被携带、被表现。

总之，核酸、蛋白质和多糖分子中构件分子的有序性都是信息的载体基础。

核酸、蛋白质和多糖分子中链的长短、链的数目、螺旋的方式、亚基的数目

是决定信息携带量的基础。原核生物的核酸分子小于真核生物的核酸，所以原核生物的基因组小于真核生物。真核生物不仅 DNA 分子量大，而且每个细胞中同时具有多条染色体，所以携带的信息量是原核生物无法相比的。

1.5 生物大分子结构的主次性

蛋白质、核酸、多糖和脂类以构件分子聚合成主要部分，同时大多以复合形式存在，复合的方式有两种：一种是蛋白质、核酸、多糖和脂类彼此相互复合，如核蛋白是核酸和组蛋白等的复合体、糖蛋白是多糖和蛋白质的复合体、脂蛋白是脂类和蛋白质的复合体，这种方式中蛋白质是复合体的主体，其余是配体；第二种方式是蛋白质、核酸、多糖和脂类同无机原子和小分子有机物结合，如磷蛋白、铁蛋白、钼蛋白和以维生素辅酶为辅因子的酶类。这两种复合形式的主次性无论是在结构还是在作用上都充分体现出：主导成分的结构很少发生化学组成的变化，主要是构象异构，而辅助成分主要是传递电子，转运化学基团和无机离子；主导成分决定着复合体本身的种属差异，而辅助成分决定着生物化学反应的性质，如氧化还原、脱羧羧化等；一种辅助因子可以和数种主导成分结合，由此形成了化学反应性质相同的各类复合体，如黄素酶类、转氨酶类、膜蛋白、受体糖蛋白等。

通过对生物大分子结构和功能主次性的研究，已使人们对基因调节的基础与癌变之间的关系有了重新认识，提出了癌变的效应中心理论。如蛋白质的磷酸化与脱磷酸化、 Ca^{2+} 与 CaM 、cAMP 与 IP_3 等，这些重大发现已经成为分子生物学的焦点问题。这些效应物的发现，把生物体的代谢调节从整体到细胞、从代谢途径到基因调节、从生物的体外环境到生物的内部反应完全联系在一起，使原本被认为甚为复杂的问题逐步变得简单和具体。

1.6 生物大分子自身功能的主次性

生物大分子在功能上的分工有主次之别，这种主次之别是本身所具有的，辅助成分的作用仅仅是协助和参与而已。

在具备了大量的蛋白质和核酸一级结构数据之后，采用专一性抑制剂方法，结合使用物理观察手段，人们对蛋白质和核酸的一级结构和空间结构有了区别划分的可能，现已清楚地知道，蛋白质和核酸的一级结构之间有主次之别。

蛋白质种属差异性与生物进化的关系的研究为分子分类提供了许多事实。其中各种生物细胞色素 c 中氨基酸顺序的差异与分歧时间的研究结果成为一个范例。60 个以上种属的细胞色素 c 氨基酸顺序被测定，其中 27 个位置的氨基酸残

基,包括第 70~80 位在已测试的种属中是相同的,已证实这些残基与血红素连接、与酶结合等有关。

免疫球蛋白的重链和轻链都有可变区和恒定区之别。可变区决定着免疫球蛋白之间的差异,是各种免疫球蛋白特异性的基础,而恒定区是免疫球蛋白的基本结构。在三级结构中,可变区主要分布在相邻 β 折叠的连接区,而恒定区则主要分布在这些 β 折叠上,9 个 β 折叠沿长轴方向聚集成松散束状。

酶分子活性中心的残基组成也有许多规律性。如许多酶的活性中心都有丝氨酸,这些酶统称丝氨酸酶类,它们具有称为“天冬氨酸—组氨酸—丝氨酸”电荷中继网的空间结构。

在已知的酶中,DNA 聚合酶 I 的一级结构与功能的关系引人关注。DNA 聚合酶 I 经枯草杆菌蛋白酶有限水解,可以得到分子量为 75kD 和 36kD 的两个片段。大片段通常叫做 Klenow 片段,具有 $3' \rightarrow 5'$ 核酸外切酶活力和 $5' \rightarrow 3'$ 聚合酶活力;小片段具有 $5' \rightarrow 3'$ 核酸外切酶活力。

这种同时具有 $5' \rightarrow 3'$ 聚合和 $3' \rightarrow 5'$ 外切能力的 Klenow 片段已经克隆生产,并广泛用于分子克隆技术中。

真核细胞中脂肪酸的生物合成酶系完全不同于大肠杆菌。大肠杆菌脂肪酸合成酶系以无催化活性的脂酰载体蛋白为中心,6 种酶共同形成一个复合体;而真核生物则以亚基的方式完成与大肠杆菌相同的脂肪酸从头合成。酵母脂肪酸合成酶 $\alpha_6\beta_6$ 由两种不同亚基组成, α 链具有 2 种酶活力, β 链具有 4 种酶活力。哺乳动物以相同亚基形成二聚体,每个亚基折叠成三个结构域,结构域 I 有三种酶活力,结构域 II 有一种酶活力。这种以共价键将原本不同的酶连接在一起而成为一条多肽链的现象,具体地反映了基因的进化方向。

从酶的一级结构的主次性到功能的主次性分析,人们无疑会受到启发,蛋白质工程、酶工程正是如此,人们从完全模拟到部分模拟,进而实现人工组合模拟,人工合成多功能蛋白、多功能酶当然是可能的,也是必要的。

第二章 生命物质代谢的特点

2.1 降解的特点与方式

生命物质代谢可划分为分解和合成、能量代谢和物质代谢两个方面。生命物质代谢通过所谓的代谢途径进行。生命运动是通过生命物质各自的新陈代谢和共同的协作完成的。认识和掌握生命物质代谢的共同特点很有必要。

2.1.1 生命物质的降解特点

生命物质的降解是一个分子由大到小的过程。蛋白质降解历经蛋白质→多肽→氨基酸的过程；核酸降解历经核酸→核酸碎片→核苷酸的过程；多糖历经多糖→多糖碎片（双糖、三糖、糊精等）→单糖的过程，脂类降解历经脂类→甘油、脂肪酸和胆固醇等的过程。

2.1.2 生命物质降解的方式

生命物质的降解方式有 4 种：水解、硫解、磷酸解和焦磷酸解。

蛋白质和核酸的降解方式主要是水解。通过在肽键中加一分子水，而使肽键断裂，形成游离的羧基和氨基；通过在 3', 5'-磷酸二酯键中加入一分子水而使酯键断裂，形成游离的 5'-磷酸基和 3'-羟基。由于核酸分子中的酯键为二酯键，断开后磷酸基附在核糖的哪一个碳原子上决定了生成什么样的核苷酸，各种核酸酶的主要产物是 5'-核苷酸。5'-核苷酸是核酸生物合成的正常底物，可以再被聚合合成核酸。

多糖降解是通过磷酸解进行的。降解的产物首先是磷酸化的单糖。在降解产物结合有磷酸基这一点和核酸相同。生命物质构件分子的磷酸化实际上是一种生物活化。这样活化后的物质可以进一步彻底分解或再合成。

脂类的降解以水解为主，甘油三酯、磷脂的降解以水解完成，胆固醇的降解实际上是一种转化。甘油三酯水解后生成的脂肪酸进一步降解时通过硫解，即加一分子辅酶 A 而转变成乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 实际上也是一种活化分子，可以分别进入多种合成和分解途径。

2.2 生物大分子的分解

2.2.1 生命物质分解的特点

降解之后形成的各种小分子进一步降解称为分解。分解的最终产物是 CO_2 、 H_2O 、 NH_3 、 H_3PO_4 和 SO_2 等最简单的无机物。但因种属差异，各种物质分解的最终产物有所不同，例如人以尿素形式排氨，人体一般不能打开苯环，人以尿酸作为嘌呤碱代谢的最终产物，人体一般不以完全开环方式排出胆固醇。

生命物质碳骨架的彻底分解经三羧酸循环完成。三羧酸循环是糖有氧分解的主要途径。但脱氨后的氨基酸骨架、脂肪酸 β -氧化后形成的乙酰辅酶 A，同样通过该途径彻底分解。有些氨基酸的碳骨架和嘧啶碱的分解产物不能进入该途径而是转变成另外一些有机物。这些有机物要么直接排出体外，要么参加维生素、激素等重要物质的合成，其中有些是活性小分子。

2.2.2 生命物质分解的作用

生命物质分解的作用一是获得能量，二是获得重要的中间物。获得的能量不仅满足耗能生理作用，如运动、体温维持、物质运输、信息传递等的需求，而且用于合成新的物质。每种生物自身能合成的物质的起始物质也正是分解获得的中间物，如各种有机酸广泛用做氨基酸合成的碳骨架，乙酰辅酶 A 是异戊二烯类聚合物的共同前体，NADPH 是脂肪酸生物合成的还原剂等。两种酰胺（谷氨酰胺、天冬酰胺）用于储存氮和合成蛋白质。

2.3 生命物质合成的特点

总体说来，生命物质的合成是一个由小到大、由简单到复杂的过程。可以分为半合成和从头合成。

蛋白质、核酸、多糖和脂类的聚合是一个由小到大的过程，是一种半合成；而氨基酸、核苷酸、单糖、脂肪酸和胆固醇等的合成不仅仅是由小到大、由简单到复杂，对于自养生物说来，是这些生命物质从无到有的过程，是从头合成，是一个储能的过程。

生命物质生物合成的中心是光合作用和固氮作用，光合作用将二氧化碳和水经光能驱动转化为单糖，这是生命物质碳骨架的根本来源。固氮作用将空气中的氮气合成氨，进而和碳骨架结合，与土壤中吸收来的磷酸相结合，形成了氨基

酸、核苷酸、脂肪酸。

生物的物质合成是一个将无机物转化为有机物的过程。自养生物直接完成这一过程，异养生物间接完成这一过程，是对自养生物生物合成作用的补充。糖是最基本的生命有机质。

2.4 生命物质代谢的条件

酶促反应是生命物质代谢的基本特点。酶促反应源自生物体，在生物体内的生理条件如生理温度、pH、渗透压及水相下进行。

生命物质代谢通过酶促反应进行。酶促反应是有条件的，是有限的，酶促反应离不开酶，离不开生理条件，人工模拟还只能限于局部的模拟，是结果的局部体现，只需模拟其优秀的一面。

至今已了解酶的作用并非万能。在 6 大类酶中，酶的能力实际就是在已有的分子之间进行基团传递。传递电子、氢、氧的称为氧化还原酶类；传递水分子的称为水解酶类；传递其他基团的称为转移酶类；异构酶类实际上就是催化同一分子内基团转移；合成酶类依靠能量驱动，将小分子连成大分子，自然也是一种酶的搬运和转移能力的体现；裂合酶类是名符其实地催化基团转移，裂合酶类催化的结果是形成或者打开双键。

酶的寿命是一定的，酶本身也在不断地进行自我更新。

酶的能力是受调节控制的，不仅酶的量可以不断改变，酶自身催化能力的大小和有无也是受调控的。一种酶可以同时有几种催化能力，如反转录酶、原核生物 DNA 聚合酶 I，当一种能力下降时，另一种能力可能加强。酶具有双向调控能力。

生命物质代谢处于动态平衡之中，实现这种动态平衡的机理主要通过负反馈来实现。

实现酶催化作用的条件就是生命物质代谢所需的条件。

2.5 生命物质代谢之间的互补性

对人体而言，有 8 种氨基酸、多种不饱和脂肪酸和绝大部分维生素不能自身合成，而要靠每天食入获得。这些必需的物质主要来自植物，个别来自微生物。植物不能产生足够的二氧化碳、氮和各种无机盐，需要依赖异养生物对有机物的彻底分解来补充。

生命物质代谢在种属之间的互补性就是一种生态学上的生物链关系。

在同一种生物体内，物质代谢也具有互补性。生物大分子和无机小分子之间

的互补,各种生物大分子代谢途径之间的互补,合成代谢和分解代谢、能量代谢和物质代谢之间的互补,这些互补的实质就是一种内在联系。生物体的代谢是一个整体,既独立又有联系,认识这种互补性意义重大。以钙离子作用为例,其浓度和分布变化涉及到生物体生命活动的方方面面,从基因调节和细胞分化至肌肉收缩,都离不开钙离子作用。磷酸化作用覆盖的范围更广。

生物代谢的互补性是生态平衡的基础。

了解各种互补的事实,可以加深认识各种生物物质代谢的特点。例如,自然界芳香化合物的根本来源是植物和微生物,古植物是煤炭的来源的道理就在于此;生物碱、酚类、萜类主要来自植物;纤维素、木质素、花生素来自植物,人体无法利用,反刍动物和某些真菌能利用纤维素,但能利用木质素的生物了解甚少;人体不能合成苯环,不能合成大部分杂环化合物,如维生素中的杂环、生物碱中的杂环;人体不能合成大部分萜类,但并非有萜类的大小限制,胆固醇有27个碳原子、动物和人体能合成,由此衍生出许多重要的物质,如性激素、肾皮质激素等,而比胆固醇小得多的柠檬醛、樟脑,动物和人都不能合成。这些事实说明,生物种属之间的物质代谢互补是物质种类的互补而非分子大小的互补。

动物和人的糖异生虽然也可合成葡萄糖,但从根本说来,光合作用是自然界糖和其他有机物质的基本来源。

2.6 生命物质代谢的活化方式特点

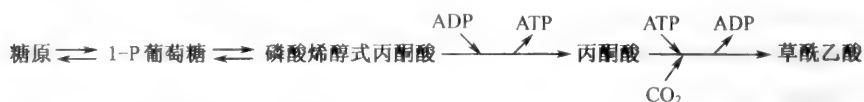
每种物质代谢的活化方式不同。在糖的聚合和降解反应中,后者以磷酸化己糖为活化方式,包括1-磷酸化、6-磷酸化、1,6-二磷酸化3种方式;前者则以UDPG(ADPG、GDPG)形式为主。甘油三酯的合成采取L- α -磷酸甘油和脂酰辅酶两种活化方式。脂肪酸分解和合成主要以脂酰腺苷酸和脂酰辅酶A方式。磷脂的合成有CDP乙醇胺(胆碱)、CDP-二脂酰甘油、L- α -磷酸甘油、PAPS等活方式。胆固醇的生物合成以焦磷酸方式为主,如IPP、DPP。氨基酸活化以氨酰腺苷酸方式进行。核苷酸本身就是一种活化方式。S-腺苷蛋氨酸是甲基的活化方式之一。

上述各种活化方式共同的一面就是它们几乎都是磷酸化产物。“磷是生命物质代谢的中心”的观点反映了这一特点。

生物选用磷酸化方式的原因至今不大了解。我国科学家赵玉芬为此进行了富有成效的研究;她发现,生物体中的有机物可以自发地磷酸化,磷酸化产物便处于不稳定状态。

2.7 生物化学反应的可逆性

在6大酶类的通式中，一般用可逆符号表示酶促反应，即酶促反应都是可逆的。实际并非如此，生物体内许多反应正反并非由同一酶催化。涉及能障的许多生化反应都是采用绕道走的方式来进行。如：



这是糖原分解代谢反应基础上的“绕道”酶促反应，是糖异生与糖酵解反应不同之一。丙酮酸要逆转为磷酸烯醇式丙酮酸，“绕道”进行且耗能。

另外，生物体内有许多 $\Delta G'$ 为正值的反应可以进行。这从理论上似乎违反了热力学定律。

上述两种与酶促反应可逆性有关的问题还限于初步的解释。

首先应当肯定，化学反应的可逆性是绝对的。讨论化学反应的可逆性，意味着有一些反应在化学上不可逆（单向）。这类反应可以用 $A + B \rightarrow C + D$ 来表示，但这不过是化学反应中可逆反应的极端情况，由于它的平衡“位于右边那么远”，显得反应朝这一方向进行到完全。表现的单向反应的特征是，它的 $\Delta G'$ 呈极大的负值（因而 K_{eq} 也极大）。

另外，化学反应可逆性的绝对性不会因为酶促作用而改变。酶不改变化学反应平衡点，即 K_{eq} 值，它只对孤立酶促反应而言。

基于上述两个原因，教科书中的酶作用通式一般用 \rightleftharpoons 表示。

生物为何采用“绕道”方式来克服能障，耗散结构理论的解释是：一个远离平衡的开放系统，通过不断地与外界交换物质和能量，在外界条件达到一定的阈值时，可能从原有的混沌无序状态转变为一种在时间和空间上或功能上有序的状态，这种远离平衡状态形成的新的有序结构即所谓的“耗散结构”。从这一理论出发，酶促反应在生物体内的平衡就是经典热力学的非平衡，或者说，对于非酶促反应来说的平衡，在酶作用下出现了新的平衡。这等于说，酶在生物体内催化的反应，已经对经典平衡进行了调整。这种调整表现在两个方面：一是生物体中的不可逆反应是明确的、肯定的，所以生物要将不可逆反应经绕道而变成可逆，这是酶自身及酶的分区存在、细胞膜的隔离所致；第二种表现是生物体中许多 $\Delta G'$ 为正的 reaction 可以进行。

关于 $\Delta G'$ 为正的 reaction 为什么在生物体内能够进行，一直有两种另外的解释，一种是活度，一种是放能反应和吸能反应的偶联。后一种解释很难说明生物体内为什么这类反应的逆反应也并非同时有吸能和放能的偶联。

总之，生物体内有不可逆反应存在。

酶自身的可变性，按照传统的催化剂的概念，反应前后催化剂自身不改变。随着人们对生物催化剂的本质的不断认识，这一认识已经发生改变。

在别构酶中，别构剂可同酶进行非共价结合，虽然酶的化学结构没有发生根本改变，但其构象发生改变。酶促反应的速度甚至方向也发生改变。而共价修饰酶类，被共价修饰的酶成了另一种酶的底物，发生了磷酸化—脱磷酸化、AMP化和脱AMP化的可逆的变化，酶的化学结构改变了，空间构象也改变了。

关于RNA具有催化能力的发现，更充分地说明了反应前后酶自身发生了改变，四膜虫的rRNA剪切成熟过程就是这样。

第三章 生物化学的基本内容

生物化学是生命的化学。是用化学的原理和方法解释生命现象的科学。由于化学和物理学的紧密联系，生物化学不单纯采用化学的原理。相比较而言，至今的生物化学知识仍然以化学的原理和方法为主。

3.1 氧化还原

纵观全部生物化学知识，氧化还原过程处处存在。从具有特殊活性的小分子到生物大分子的作用，从合成到分解，三种氧化还原方式（电子得失、加氧脱氧、加氢脱氢）都可见到。

3.1.1 生命物质的两性解离

氨基酸、核苷酸、磷脂等分子中同时有带正电荷和负电荷的基团存在。形成大分子结构后，就赋予了蛋白质、核酸、脂类结构两性解离的特性。生物大分子两性解离的特点是这些大分子内部结构形成、各种大分子相互作用、大分子同小分子包括无机离子相互作用的基础。

3.1.2 生物电

生物电如何产生，至今不甚了解。但蛋白质分子的半导性、细胞的膜电位、神经原动作电位传导、能量转换中线粒体膜和叶绿体膜的作用都与生物大分子的氧化还原有关。生物电的产生和传导问题，归根结底是电子传递或得与失的问题，或者说是电极差问题。生命大分子的极性结构一方面使自身带电，另一方面增大了生物组织的介电常数。

3.1.3 酶作用的机理

一些酶的作用中心具有“电荷中继网”，如丝氨酸类酶（胰蛋白酶、弹性蛋白酶等）的共价催化方式中，亲核基团提供电子，进攻底物中缺电子的碳原子。一些酶的中心通过组氨酸残基的咪唑基既作为质子受体，又作为质子供体而进行

酸碱催化（胰核糖核酸、牛凝乳蛋白酶）。

3.1.4 别构效应

蛋白质的构象异构主要方式是别构效应。具有四级结构的蛋白质，当亚基之间的连接为盐键时，或者别构效应中心对 pH 变化敏感时， H^+ 浓度变化无疑会影响这些蛋白质的构象。

3.1.5 能量转化

生物物质代谢作用之一是能量转化。营养物质分解、光合作用和其他生物合成过程时出现的脱氢、加氧和失电子是生物体内最基本的代谢过程。氧化磷酸化过程就是从底物上脱下来的氢经呼吸链传递而同氧结合成水，同时 ADP 磷酸化转变成 ATP 的过程。氧化脱羧就是在底物脱氢的同时，伴随脱羧的过程（丙酮酸和 α -酮戊二酸氧化脱羧）。动物和植物体中各种加氧酶催化生成过氧化氢和其他各种过氧化物的生成更是一种氧化过程。

3.1.6 生物固氮和硝酸盐的同化

极为稳定的氮气经生物固氮作用，转变为 NH_3 ，这一过程的本质是一种还原过程。如豆科植物根瘤中共生细菌的固氮酶依靠自身的铁硫蛋白和钼铁硫蛋白将电子转移给氮气。

高等植物能将根部所吸收的硝酸盐逐步还原成亚硝酸盐，最后还原成氨。

总之，氮的同化是一个还原过程。

3.1.7 碳的同化

有机质中的碳原子归根结底来自二氧化碳。二氧化碳经光合作用还原成糖。二氧化碳经动物、植物和微生物的氨基甲酰磷酸合成酶催化，转变成氨基甲酰磷酸，氨基甲酰磷酸再经一系列转变成成为核苷酸的过程总体说来也是一种加氢还原。二氧化碳经光合作用第一步还原成糖，糖的代谢物质再进一步还原成脂肪酸和胆固醇，所以，碳的同化仍是一个还原过程。

3.1.8 体液 pH

正常情况下动物体内 pH 的变化是有限的，这是因为动物甚至植物和微生物的体内有缓冲系统。动物和人体主要有碳酸盐、磷酸盐和蛋白质 3 个缓冲对，对体内过多的氢离子和氢氧根离子有一定接受能力。

3.2 构象异构原理

普通有机化合物的结构异构主要是构造异构和立体异构中的顺反异构和旋光异构。生物大分子不仅有这些一般的异构，更重要的是构象异构，蛋白质的别构和 DNA 的拓扑异构是生物大分子构象异构的典型代表。

构象异构是由生物大分子中 δ 键旋转所致，这是不同于其他异构体形成的根本所在。构象异构不改变大分子的元素组成和分子组成。蛋白质的别构仅仅是除一级结构以外空间结构的改变，是折叠方式的改变。核酸的拓扑异构仅仅是二链相互缠绕次数（按一定方向）的改变。

3.2.1 生物大分子是“弹性分子”

细胞内外的各种变化都可以通过生物大分子构象异构的“弹性”表现出来。有构象异构的生物大分子起码有两种状态，而且是可逆的。当导致某种构象异构的条件消失时，这种生物大分子又会回到原来的构象，例如血红蛋白在不同的 pH 条件下的构象异构。

3.2.2 酶活性的别构调节

生物体内有许多酶，它们往往处在多酶系列的分叉口，这些酶的活性中心有一类称为别构效应中心的部位，专门用来调节酶反应的速度。别构效应中心结合的对象是别构效应物。底物有时也是效应物。一般而言，大部分别构酶的底物—初速度关系曲线不符合米氏公式。

如果仅仅考虑酶本身空间结构正常情况下可变的一面，诱导契合学说所揭示的酶同底物结合时的构象调整，也是一种构象异构。

在酶进行催化作用时，有时构象也在不断改变。如同一个人用力搬东西时身体各部分协同弯曲一样，酶的空间结构的这种改变也是一种构象异构。

由于诱导契合和酶在催化底物过程中的构象异构研究得不很深入，所以一般

所指的酶的别构主要是指受效应物影响使酶活力改变的别构。

3.2.3 生物大分子的识别能力

各类生物大分子之间有相互作用,这种作用有直接和间接两种方式。其中直接的相互作用有专一性和非专一性两种。专一性相互作用的基础无非是双方的化学结构和空间结构两个方面。由于各种生物大分子在相互作用之前已经具有了各自的空间结构,所以相互识别主要是一种空间结构水平的作用。双方相互作用后的效果的进一步传播靠什么?在没有发现一种新的传播介质之前,目前人们关注的自然仍是构象变化。

目前已知的生物大分子的相互识别包括 DNA-DNA、RNA-RNA、DNA-RNA、DNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质。这等于说,生物大分子之间具有普遍的专一性识别能力。这种识别主要是空间结构水平的识别。

3.2.4 生命过程能量转换的研究与构象异构

1997 年诺贝尔化学奖授予美国的 Boyen、英国的 Walken 和丹麦的 Skou。前两人在 ATP 合成酶如何合成 ATP 的分子机理方面对 60 年代化学渗透学说做了进一步研究。ATP 合成酶由 3 个部分组成:基部、头部和颈部。前者位于线粒体内部,头部伸出朝向内膜内,颈部将头部和基部相连。催化亚基位于头部,由 3 个 β 亚基组成中心。Boyen 认为此中心的构象可变:一种构象有利于结合 ADP 和无机磷酸;一种构象有利于 ATP 合成;一种构象有利于 ATP 释放。这三种构象变化是头部催化亚基中心转动过程中交替出现的。旋转所需的能量来自 H^+ 流,这就是旋转催化假说,1994 年 Walken 等经过对牛心线粒体 ATP 合成酶结晶和 X 射线衍射,证实了 Boyen 的旋转构象变化假说。

Skou 的成就在于发现 K-ATP、Na-ATP 酶,这是消耗体内 ATP 最多的酶(1/3 ATP)。其他科学家已将其一级结构测出,但晶体和空间结构仍未完成。

3.2.5 朊病毒与构象异构

1997 年诺贝尔生理医学奖授予美国加州旧金山大学 Stanley B. Prusien,表彰他发现朊病毒及其致病机理。以往发现的病毒均为核酸,致病原因主要与核酸有关,而一种蛋白质分子通过构象变化而致病,无疑是对病毒的传统认识和生物学中遗传信息的唯一载体是核酸的挑战。Prusien 1972 年起通过对人类克雅氏病致病因子的研究,发现了这种蛋白病毒(prion)。20 多年间,相继在脑蜕化病、

疯牛病等得到证实。这种蛋白在翻译合成后通过改变构象而致病，这是由 N 端 α 螺旋折叠为 β 折叠而引起。正常构象经此种转变后，对热和蛋白酶异常稳定，在体内积累到一定水平（感染到发病可有几年到十几年的潜伏期）后导致病变。

3.3 平衡原理

生命物质运动不同于非生命物质运动的根本区别，在于生物新陈代谢的自我调节。这种调节的结果便是各种平衡。

3.3.1 氮 平 衡

氮平衡即所摄取的蛋白质的氮与所排出的（尿素等）氮之差。在生长发育阶段的婴幼儿，机体摄取的蛋白质大部分用于机体的生长发育、合成新组织的蛋白质，故处于正氮平衡，反之叫做负氮平衡。长期的负氮平衡引起体内蛋白质不足，由此产生的临床症状如果引起人们注意，负氮平衡在一段时间内又会得到纠正。

3.3.2 碳 平 衡

无论哪一种营养物都有碳原子。但糖类中的碳原子是其余各种营养物中碳原子的来源，如果食物中糖的成分缺少，体内的脂肪分解加速，糖异生加速，导致酮体增高，可能出现酸中毒，蛋白质合成减少，这些不良现象都是因为生物要维持三羧酸循环的正常进行。三羧酸循环是各种物质彻底分解的途径，同时也为蛋白质合成所需的氨基酸提供碳骨架。

3.3.3 能量平衡

产能和耗能反应之间的平衡通常用能荷来表示。能荷等于 ATP 和 $1/2$ ADP 占体内全部腺苷酸（ATP + ADP + AMP）浓度的百分数。能荷过大时负反馈抑制产能分解反应。维持机体需要消耗的最低量的能量称为基础代谢。

3.3.4 水 平 衡

生物体的组成大部分是水，而且含量变化很大。植物一方面通过根部等吸收水，一方面通过蒸腾排出水；动物饮水和排水有了专门的系统和组织。必须注意

到，生物也能生成水，一个正常的人每日生成水 800~900g，这部分水是呼吸链转化能量时产生的。

水的平衡总是和矿质平衡联系在一起的。钠、钾、氯等离子是细胞内外主要的离子，与渗透压、膜电位密切相关；钙、镁、磷与代谢调节、骨的形成等密切相关。生物不能合成矿质，生物也不能使矿质消失，每一种矿质元素进出生物体的机会和多少取决于生物的摄取、保留和排泄。

3.3.5 酸碱平衡

细胞的化学反应是酶促反应。细胞的结构物质主要是蛋白质和脂类。pH 的变化对蛋白质、酶和脂类的结构影响很大，每一种生物都有一个相对稳定的 pH 范围。动物的 pH 维持和调节能力较强。酸中毒和碱中毒是动物和人的 pH 调节能力下降或有限的结果。

必须注意到，生物的各种平衡是一种动态的平衡。同一种平衡有不同的水平，旧的平衡被打破，新的平衡又产生；生物的各种平衡是有限的平衡，因为生物的调节能力是有限的；建立平衡的基本途径是反馈，特别是负反馈。

3.4 循环原理

生物体中有各种各样的循环。三羧酸循环、卡尔文循环、尿素循环、乙醛酸循环、磷酸戊糖循环是代谢途径；氮循环、碳循环、氧循环、水循环是物种之间、生态系统之间的循环；动物体内还有血液循环。循环的特点是重复利用，是一种节约机制。

第四章 蛋白质生物化学

如果包括作为催化作用的酶类及蛋白质激素,蛋白质生物化学在各种生物化学教科书中至少占到全书一半的内容。这足以说明蛋白质知识在生物化学中首屈一指的地位。

为了使大家对蛋白质的生物化学知识有一个全面、系统的掌握,特将蛋白质化学、酶、蛋白质降解、氨基酸代谢、蛋白质生物合成5部分内容融为一体。

蛋白质生物化学知识内容丰富,主要的知识点包括以下几个方面:

(1) 出现在蛋白质中的氨基酸结构式、代写符号、分类地位,这些知识是要记忆的。

(2) 蛋白质中氨基酸组分的测定技术。

(3) 蛋白质结构的划分及其相互关系。

(4) 蛋白质一级结构测定原理和技术。

(5) 蛋白质分离、纯化、定量分析原理和技术。

上述(2)、(3)、(4)、(5)知识点是氨基酸和蛋白质理化性质的应用。

(6) 酶的结构特点。

(7) 酶作用的一般原理和机理。

(8) 酶促反应速度。

一般认为,酶学知识目前主要是概念问题。

(9) 蛋白质降解与水解蛋白酶类。

(10) 氮代谢。

(11) 人类必需氨基酸的生物合成途径。

(12) 遗传密码的特点。

(13) 蛋白质生物合成的条件和步骤。

(14) 毒素蛋白。

另有以下知识比较复杂,且正在发展之中。

(15) 蛋白质折叠与去折叠,这是目前蛋白质生物化学乃至分子生物学的基础性难题。

(16) 酶作用的机理。

(17) 朊病毒。

(18) 多肽生长因子。

上述知识点在第一次学习中已经接触过,在此之后进一步加深理解和理顺这

些内容,从中悟出内在联系和规律,确定其中的重点和难点,方可实现这些知识的巩固。

4.1 肽和蛋白质的全水解及氨基酸组分测定

肽和蛋白质的全水解通常采用 6mol/L HCl 于 110℃、真空条件下水解 10~24 小时,同时另用 5mol/L NaOH 于 110℃、真空下水解 20 小时。因为前者水解过程中破坏了色氨酸,但所得的氨基酸不消旋;后者不破坏色氨酸,但多种其他氨基酸遭破坏。二者同时采用,即可获得两种酰胺外的其他氨基酸。两种酰胺的总量可直接由水解液中释放的氮量求出。近年来用甲基磺酸代替 HCl。色氨酸也可用分光光度法测定。

20 种氨基酸在蛋白质中分布的频率从大到小排列如下: Leu、Ala、Ser、Gly、Val、Glu、Thr、Lys、Ile、Asp、Arg、Pro、Asn、Phe、Tyr、Met、His、Cys、Trp。从中可以看到, R 基愈特殊,分布频率愈小。

酶法全水解成本高、难度大,主要用于测序时的部分水解。

通过全水解获得的多肽或蛋白质水解液要经过分离和定量才能求得各种氨基酸组成比。

通常采用强酸型阳离子交换树脂加茚三酮反应对全水解液进行分离定量。自动化氨基酸分析仪就是采用这种方法设计而成的。在洗脱过程中,洗出的顺序是酸性氨基酸—中性氨基酸—碱性氨基酸。和阳离子交换树脂静电吸引越小,洗出的顺序越向前。

采用毛细管电泳、气相色谱、高压液相色谱技术也可分离氨基酸。

4.2 多肽或蛋白质的氨基酸序列测定

知道了多肽或蛋白质的氨基酸组成比不等于得知它们的顺序。蛋白质化学结构、平面结构或曰一级结构是指氨基酸的序列。

目前尚无一种办法能够直接和一次测定氨基酸排序。蛋白质分子一般由几十个乃至几千个氨基酸排列而成,部分蛋白质还有多种肽链。根据化学反应平衡原理,通常要将长的肽链化大为小,然后分段测定,最后再拼凑成完整肽链。即使自动化的顺序分析仪也要这样做。

测定肽链 N 端或 C 端的残基是为了知道蛋白质由几条链组成,目前主要从 N 端测定。

测定肽片段的方法和测末端的方法相同。

目前测序的方法主要是 Edman 法。此方法和 DNS 相比较,优点在于 PITC

与肽链的游离 α -氨基结合后，无需酸水解。一次反应切下 N 末端一个残基，其余的肽链部分又可重新进行这一反应。

Edman 法一次可以连续测出 80 个左右的残基顺序，蛋白质顺序仪是以此为原理设计的。

蛋白质顺序的测定也可用 cDNA 方法推导出来：根据蛋白质对应的 mRNA 顺序，经反转录形成 cDNA，然后测定 cDNA 顺序，根据遗传密码，进而推导出蛋白质顺序。

受 Edman 测序能力的限制，大的肽链测序前要化大为小，所以不能采用全水解方法。部分水解的方法选用时至少在两种以上，切点不能相同，切点不能过多，切点的专一性要强。

按照国际惯例，肽链的书写是从 N 端到 C 端。对于每一个肽键两侧的氨基酸残基，位于肽键左侧的成为将来新生的 α -羧基端，位于肽键右侧的成为将来新生的 α -氨基端。熟悉这一点很重要，因为由此意味着，习题中告诉了某种专一性水解方法，也就等于告诉了切点的专一性，同时也告诉了新生的肽片段 α -氨基和 α -羧基端的残基种类。有些专一性水解方法只选肽键左侧残基，有些只选右侧残基，这些都要弄清。

要记住各种专一性水解方法的切割位点很难。但仔细分析会发现，仍有规律可言。常用的各种蛋白酶，大部分来自动物消化液，少部分来自细菌，其中来自动物的蛋白酶普遍切割位点为人类必需氨基酸，且以芳香族氨基酸为主：胰蛋白酶选左侧为 Lys、Arg；糜蛋白酶选左侧为 Phe、Trp、Tyr；胃蛋白酶选左侧为 Phe、Leu、Trp、Tyr；嗜热菌蛋白酶选右侧为 Leu、Ile、Phe、Trp、Val、Tyr、Met；金黄色葡萄球菌蛋白酶 C 和 Glu 蛋白酶选左侧为 Glu、Asp；梭状芽孢杆菌蛋白酶 C 和 Arg 蛋白酶选左侧为 Arg。来自植物的木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶专一性不强。

胰岛素生物化学是蛋白质化学长期研究的课题。最早测序的蛋白质，最早人工合成的蛋白质，最早的基因工程产品，最早发现有蛋白质前原、蛋白质原，信号肽、连接肽的发现，胰岛素受体磷酸化变异的发现使胰岛素研究成为基因调控的首选对象。

要熟悉胰岛素一级结构知识：A、B 两条链，分别含 21 和 30 个氨基酸残基，A 链有一个链内二硫键（6—11），A、B 链之间有两个链间二硫键（7—7 和 20—20）。

要熟悉肌红蛋白和血红蛋白一级结构知识，要注意谷胱甘肽、环肽的结构特点，特别是它们的非 α 羧基和氨基形成的肽键。

4.3 蛋白质的二级结构

蛋白质二级结构主要指主链的扭曲,即主链的构象。构象与构型的根本区别在产生构象和构型的原因。构象是因 δ 键旋转所致,构型是分子中各原子的空间固定排列方式。生命物质的构象变化意义重大。

研究构象的早期主要研究方法是X射线衍射。

多肽链的长度,主链中 δ 键的自由旋转性以及肽键的偏双键性质是蛋白质分子二级结构产生的原因。

肽键中的肽键的实际结构是一个共振杂化体。肽键中的C=N键长介于C—N单键长度(0.148nm)和C=N双键长(0.127nm)之间,约为0.132nm。肽键直接相连的4个原子形成肽平面,肽平面中的两个C_a反式存在时较稳定。

如果把肽平面看作是肽主键中限制 δ 键旋转的因素,把在肽平面内两端的两个 δ 键看作是能自由旋转的因素,即 Φ 角(C_a—N)和 Ψ 角(C_a—C),那么,通过 Φ 角和 Ψ 角的对应关系可以从理论构思出各种可能的多肽链构象。Ranachandran图即是如此。

目前已知的肽链二级结构 Φ 角主要为负值。已知的肽链二级结构主要是用毛发和蚕丝研究得出的。描述每一种二级结构模型的要点包括 Φ 、 Ψ 角值,稳定此种二级结构的化学键的类型和位置,形成此种二级结构需要的肽链数目,彼此的方向关系,螺旋的方向,螺旋每圈包含的残基数,相邻螺旋之间的距离。

蛋白质二级结构类型目前主要有 α 螺旋和 β 折叠,都是由Pauling等发现的。蛋白质分子螺旋方向如何产生有待进一步研究。

要弄清 α 螺旋和 β 折叠的区别。 α 螺旋涉及一条肽链, β 折叠包括一条链回折或二条以上肽链。 Φ 角、 Ψ 角值不同,氢键来源不同。 α 螺旋氢键在一条链内形成,其方向和长轴方向平行;而 β 折叠中的氢键是链间形成,其方向垂直于肽链长轴。

一级结构和二级结构之间的关系是蛋白质结构研究的中心问题。真正弄清了一级结构的规律如每种残基的作用、残基的相互作用,才能准确预测二级结构。

目前已知的一级结构中某些残基的特点主要是通过对自然界蛋白质的数据统计分析而来的。

谷氨酸、组氨酸主要出现在 α 螺旋中,它们通常是功能蛋白(如酶)的作用中心;脯氨酸是 α 亚氨基酸,不能形成氢键,经常处于 β 转角处或者螺旋的N端;十余种氨基酸则几乎均等出现于 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角中;应特别注意的是,苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸出现在 β 转角和 β 折叠中较多,这3种氨基酸羟基可被磷酸化。正常情况下,主要是苏氨酸和丝氨酸的羟基磷酸化;癌变时,经常

出现酪氨酸磷酸化。这一现象已经成为蛋白质磷酸化—脱磷酸化的核心问题。

用物理化学方法，特别是量子力学理论开辟研究蛋白质一级结构规律新途径势在必行。蛋白质分子多肽链是一个整体，今后的长程相互作用研究更为重要。

4.4 蛋白质的超二级结构

纤维状蛋白的整体和球状蛋白的局部是二级结构的搭配组合。这就是超二级结构。必须注意蛋白质和 DNA 的超二级结构的区别。DNA 的超二级结构是指 DNA 双链分子螺旋之后的再螺旋，类似于纤维状蛋白中的超二级结构。球状蛋白中的超二级结构主要是一种邻近二级结构（可同可不同）的组合，实际上是一种相连关系。

已知的超二级结构有 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 和 $\beta\beta\beta$ 三种。

α 角蛋白属于“三右一左”($\alpha\alpha$)式，三股右手 α 螺旋一起向左拧成一根左手螺旋。

β 角蛋白既可来自 α 角蛋白充分伸展，也可见于丝心蛋白，是典型的反平行 β 折叠的平行方式的再堆积。

α 角蛋白中的半胱氨酸之间形成二硫键。 α 角蛋白具有很强的伸缩性。 β 角蛋白富含甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸，具有柔软但缺乏伸缩的特性。

胶原纤维属于“三左一右”($\alpha\alpha$)式，三股左手 α 螺旋一起向右拧成一根右手超螺旋结构。胶原蛋白 α 螺旋链至少有 5 种，至少有 4 种组合方式，但均含 1000 左右个氨基酸残基，96% 呈现三体重复 $(\text{Gly-x-y})_n$ ，x 常为 Pro，y 常为 Hyp（羟脯氨酸）。胶原蛋白很高的韧性主要来自链间赖氨酸彼此共价缩合。缩合的方式主要有两种：氧化脱氨后的赖氨酸 (ϵ -醛基赖氨酸) 同另一条链的赖氨酸形成希夫碱结构；氧化脱氨后的赖氨酸互相缩合。4 个 ϵ -醛基赖氨酸缩合形成锁链素。3 个 ϵ -醛基赖氨酸缩合形成吡啶啉。胶原蛋白分子中是以吡啶啉形式缩合的。弹性蛋白则以锁链素形式为主。

弹性蛋白的弹性来自二链、三链乃至四链之间的赖氨酸缩合。同一条链中既有左手螺旋又有右手螺旋，链内富含脯、甘、丙、缬等氨基酸。

除赖氨酸外，胶原蛋白和弹性蛋白中带电荷的极性氨基酸甚微。赖氨酸多余的末端氨基脱去并缩合成链间共价结合物，自身的极性已经丧失。由此说明了这两类蛋白质是结构蛋白的主要基础。胶原蛋白是不易被一般蛋白酶水解、加热也难以变性的蛋白质。

弹性蛋白实际上没有特定的超二级结构。只是由于在链间的连接和功能及形状类似于胶原而放在一起讨论。

肌肉细胞中的肌球蛋白、肌动蛋白、真核生物纤毛和鞭毛中存在的微量蛋

白，以及血液凝固过程中的凝血酶作用的纤维蛋白原和弹性蛋白一样，目前均无确切的超二级结构存在的发现。了解这些蛋白质，主要是在一级结构基础上认识链与链之间的局部作用，包括共价交联成网（锁链素式等）或非共价交织成网（纤维蛋白式）以及形成功能蛋白的特区（肌球蛋白的头部的酶活性区）。

纤维状蛋白并非都是结构蛋白，球状蛋白也并非都是功能蛋白，形状不完全代表蛋白质的功用。

4.5 蛋白质的三、四级结构

蛋白质三级结构的概念主要是对球状蛋白而言的。蛋白质构象变化集中体现于球状蛋白分子中。球状蛋白构象的多变性赋予机能蛋白结构和功能双重动态变化。

整体水平几乎以非静态存在（既指所处的环境，也指自身结构和功能）的球状蛋白，相对于某种特定的内环境和功能而言，理应有相对静止的一面，类同于二级结构中的肽平面形成。这种相对静止、孤立的、有规则的三维实体就是蛋白质的结构域。各个结构域之间共价相连的区域，即所谓的“铰链区”，是球状蛋白变化、运动、柔性的一面。因此，蛋白质三级结构也是在“动与不动”或“变与不变”的矛盾中形成的。

同理，结构域的内部组装类似于纤维状蛋白的超二级结构，呈现各种方式。已经确认的有3种，一种是 α 螺旋和 β 折叠共同形成的， β 折叠相互聚集成环状中心， α 螺旋分布在外侧，或者 β 折叠聚集成束状扇形展开，外侧仍有 α 螺旋半包围或部分包围；另一种为4- α 螺旋索；最后一种见于肌红蛋白和血红蛋白的亚基，由8个螺旋排成两层后形成容纳血红素的洞。

从上述已知的3种球状蛋白结构域看来， α 螺旋倾向于分布在球状蛋白的外部，而 β 折叠倾向于形成球状蛋白的中心骨架。各种动物毒蛋白尤其如此。

肌红蛋白的三级结构一直是生物化学中关于三级结构描述的典型例子。四级结构的举例毫无例外有血红蛋白。血红蛋白是肌红蛋白的类四聚体。所以，熟悉掌握肌红蛋白和血红蛋白的全部知识对理解蛋白质结构非常重要。

肌红蛋白是哺乳动物肌肉中的储氧蛋白质。153个氨基酸残基，第93位His(F9)的咪唑环N原子相连（配位）有一分子血红素，全分子由八段 α 螺旋（A，B，……H）组成，没有 β 折叠，转弯处仅为Ser，Thr，Asn和Ile等残基，仅有一个由 α 螺旋包围而成的疏水洞穴式的单结构域。

血红蛋白由4条链组成，在HbA中为 $\alpha_2\beta_2$ 。 α 链141个残基， β 链146个残基。血红素均结合在F8的His上，但不同于肌红蛋白的是，F8在 α 链中相当于第87位，在 β 链中等于92位。

蛋白质的次级结构的维持主要与氢键、盐键、范德华力、疏水作用有关。共同的特点在于这些作用力都是非共价的、很弱的化学键或相互作用，但是这些作用力都具有加和性，积少成多，集体作用。也正是由于均属于很弱的相互作用，球状蛋白质的构象才可以可变，在不断变化的生物体内环境中，通过自身的构象改变来适应各种需要。

二硫键属于共价键。在蛋白质次级结构中也经常出现，关于二硫键与蛋白质次级结构的关系有待进一步研究。自然界蛋白质中弱的非共价键是普遍的，二硫键在多亚基的蛋白质如血红蛋白中并不存在。

蛋白质分子弱的非共价的次级键在其他生物大分子如核酸中也存在。氢键是最普遍的次级键。氢键有方向性、饱和性两个特征，比较而言，蛋白质主链间形成的氢键比侧链形成的氢键多。或者说，大多数蛋白质采取使主链的 $C=O$ 和 $N-H$ 之间形成最大数目的分子内键，而 R 基形成氢键的能力留给了发挥蛋白质功能的分子表面的作用。

氢键的方向性和饱和性特征，以及在生物大分子中分布的特点，其更深层次的意义引人注目。

范德华力是分子与分子之间存在的一种力。在蛋白质和核酸分子中，由于主链单调重复，致使分子内出现基团的堆积，如氨基酸 R 基的堆积、核酸分子中碱基的堆积。范德华力正是考虑到分子本身所占的体积、彼此之间的距离的事实而提出的。但怎样具体解释这种力与蛋白质结构的关系，仍然不很清楚。

疏水作用存在于蛋白质结构中显而易见。20 种氨基酸中的非极性氨基酸的 R 基在水环境中会自发地相互聚集，类同于肥皂去污时的水包油型的结构形成。许多球状蛋白质中心有一疏水区域，如血红蛋白分子中血红素所处的内环境就是如此。

蛋白质分子中次级键的形成与作用是一个有待深入研究的问题，目前仅仅是对已有的事实的初步解释。

4.6 蛋白质的构象运动

由于蛋白质分子次级结构中化学键的脆弱性，可以推测球状蛋白质在生物内环境改变时会有什么样的结构变化。大量现有的事实表明，蛋白质分子，包括纤维状蛋白质、单链蛋白质的构象都是可变的，尤其是球状蛋白是处在不断运动的状态。目前已知的蛋白质构象运动有侧链运动、肽段运动和结构域运动 3 种。侧链运动是氨基酸残基 R 基绕 δ 键的转动；肽段运动是肽片段所处位置的变动；而结构域运动是分子部分整体相对于其余整体部分所做的相对运动。后两种实际上是会同时出现。

一些蛋白质分子表面具有高运动区域,有时被叫做“热肽”,实际上这些部位正是抗体结合区;一些酶的结构域或亚基间会出现往复式开合运动;一些蛋白质的结构域围绕相连的肽片段伸展区(常叫做铰链)相对运动。这些构象运动被用来解释蛋白质-蛋白质的相互作用、蛋白质前体分子的活化、酶同底物之间的诱导契合等。

蛋白质的构象运动不仅出现在原有的一级结构不变的蛋白质中,而且广泛存在和作用于经共价和非共价修饰后的蛋白质中。这就是调节蛋白的别构效应。要注意蛋白质构象运动和蛋白质别构运动的关系。别构是受外来调节物质作用后出现的构象运动,这种构象运动是可逆的。许多蛋白质可以在自身结合外来的修饰物或发挥功能时携带某种小分子物质后发生构象改变,进而带来自身功能的改变,蛋白质发挥作用时受外来因素影响而结构发生构象变化的现象叫做别构。具有别构能力的蛋白质主要是寡聚蛋白。别构蛋白具有专一的和外来调节物结合的部位,别构效应是蛋白质构象运动中了解最多最深入的一类,基本特点在于这种运动是同专一效应物结合后出现的,而且伴随着别构蛋白质功能的改变。

描述蛋白质别构的典型例子首先是血红蛋白,后来增加了天冬氨酸转氨甲酰酶,现在又有了3-磷酸甘油醛脱氢酶等,前两例最有代表性,应当有深入细致的了解。

描述一种蛋白质的别构作用时首先要了解亚基数目和类型,其次要了解这种蛋白质别构所需的调节物的种类、结构、来源和同哪个亚基结合。关于调节物怎样导致蛋白质别构的机理问题,基本搞清楚的仅限于血红蛋白等极少数蛋白质。

血红蛋白的4个亚基间, α 亚基与 β 亚基接触多于两个 α 链或两个 β 链之间接触的观点值得注意。因为仅从血红蛋白脱氧时4个亚基间的8个盐桥分布来看恰恰和这一观点相反,而且血红蛋白别构时,假定的氧的结合顺序是 $\alpha_1 \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \beta_1 \rightarrow \beta_2$ 。

血红蛋白别构的机理要点可概括为:一个亚基与 O_2 结合,Fe原子由卟啉环平面上方约0.06nm处落入卟啉环平面内,由此触发整个构象改变;第二是HC₂酪氨酸从F、H空隙中被挤出而得以自由旋转;第三是所有8个盐桥断开;第四是两个 β 亚基间的DPG被挤出;第五是盐桥断裂使 β 亚基构象改变, β 亚基67位(E11)缬氨酸被挤出, β 亚基同 O_2 结合。

H^+ 、 CO_2 及DPG均使血红蛋白趋于脱氧构象。 H^+ 与 α_1 缬氨酸结合使其带正电而与另一 α 亚基的末端羧基结合形成盐桥,这是对玻耳效应的初步解释,目前认为约有6个类似的盐桥因 H^+ 而增加; CO_2 使氨基甲酰化并同时释放出 H^+ ,带负电的氨基甲酰基可带来新的盐桥,放出的 H^+ 作用相同于玻耳效应;DPG有两个磷酸基,在 β 亚基之间双向结合正电荷基团。总之, H^+ 、 CO_2 和DPG均以增加盐桥的方式使血红蛋白的别构能力下降,从而也促进了氧合血红蛋白释放

O₂。

天冬氨酸转氨甲酰酶不同于血红蛋白，有 12 条肽链，分为调节和催化两类亚基，调节亚基为二聚体，催化亚基为三聚体，最终产物 CTP 为该酶的抑制剂，氨基甲酰磷酸、天冬氨酸和 ATP 为活化剂。ATP 的调节物作用涉及到能荷的问题时，通常 ATP 是作为负反馈抑制剂的。这一点要特别注意，调节亚基和 CTP 或 ATP 结合后引起构象改变，此种改变进而影响到催化亚基构象改变。

具有上述别构作用的酶都是关键酶。必须清楚，别构酶往往一种酶有多种酶活性。一种催化活性降低意味着另一种催化能力增加，绝非是一种完全的开关机制。别构酶的活性变化是可逆的。

通过蛋白质的构象运动可以对酶、泵、抗体、受体及多种水溶性细胞因子的作用机理有进一步的认识。

关于酶的作用机理的张力与变形理论，其实质就是酶与底物结合时相互作用。酶和底物分子都可以生形变，羧肽酶 A 结合底物前后 X 射线衍射结果表明形变非常明显。Tyr248 的酚羟基一下子移动了相当整个分子直径的 1/4，约有 1.2nm。

Na⁺-K⁺ 泵就是分布在膜上的 Na⁺-K⁺ ATP 酶，是一个跨膜的单肽链。同时结合有一个糖蛋白。Ca²⁺ 泵即 Ca²⁺-ATP 酶，同样是一种以 ATP 为辅基的激酶，是一个跨膜分布单肽链。二者的作用机理，目前同为磷酸化与脱磷酸化—构象运动理论。一条肽链横跨细胞膜，对称或不对称分布在膜的两侧，一条链都有着多个结构域，有的位于外侧，有的位于膜中和膜内侧，一侧结构域的运动引起其余部分连锁反应，这就是结构域的相对运动，这一运动的触发来自某一侧肽链末端的磷酸化。

4.7 氨基酸代谢

和糖、脂和核苷酸代谢相比，氨基酸代谢比较复杂，合成和分解之间的关系不密切，要全面真正理顺这些内容有一定难度。但是，如同糖、脂和核苷酸代谢一样，氨基酸代谢的内容一直变动不大，仍属经典生物化学部分。一般而言，注意以下几个方面的知识即可：

(1) 氨基酸代谢的核心是氮代谢。脱氨、转氨、氨的还原、氨的去路等知识要认真学习。

(2) 氨基酸碳骨架的代谢实质上是糖、脂代谢中间物的转化。

(3) 对于过分冗长的代谢途径，重点掌握每个途径的起始物和最终产物及重要的与调节有关的中间物。

(4) 严格区分各种氨基酸，特别是必需氨基酸在动物、植物和微生物体内代

谢途径的差异。例如莽草酸途径仅仅存在于植物和微生物。

(5) 一些氨基酸的代谢与常见病相关，一些氨基酸代谢中间物是具有重要生物功能的小分子衍生物，在医学和制药工业经常要用到这些知识。

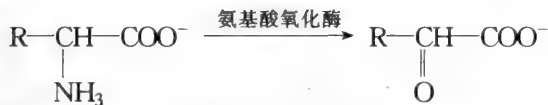
氨基酸代谢的包括以下内容：

- (1) 氨基酸的脱氨、转氨及氨的去路。
- (2) 氨基酸碳骨架的分解。
- (3) 必需氨基酸的生物合成。
- (4) 重要的氨基酸代谢衍生物。
- (5) 生物固氮。

上述内容中，(1)、(2)、(3) 是最基本的内容。生物固氮在多数生物化学教科书中仅仅是一般介绍，故略去。第(3)部分内容在微生物和植物生理学中也要讲授。活性肽的合成附在蛋白质合成之后。

4.7.1 氨基酸的脱氨基、转氨基及氨的去路

氨基酸脱氨有氧化脱氨和非氧化脱氨两种方式。前者存在于动、植物体内，是主要的脱氨方式。氧化脱氨实质是伴随着脱氢的脱氨，脱氢并脱氨后的氨基酸转变成 α -酮酸：



催化氨基酸氧化脱氨的酶可以划分为 3 大类：L-氨基酸氧化酶、D-氨基酸氧化酶和氧化专一氨基酸的酶。L-氨基酸氧化酶仅催化 L-氨基酸氧化脱氨，人和动物体内的此类酶以 FMN 为辅基。D-氨基酸氧化酶催化 D-氨基酸氧化脱氨，以 FAD 为辅基。专一氨基酸氧化酶仅催化某种氨基酸氧化脱氨，其中以 L-谷氨酸脱氢酶最为重要，此酶广布于动物、植物和微生物，一种以 NAD^+ 为辅酶，另一种以 NADP 为辅酶。该酶使氨基酸直接脱去氨基的活力最强，为别构酶。味精生产即利用微生物体内的谷氨酸脱氢酶将 α -酮戊二酸转变为谷氨酸，进而转化成谷氨酸钠。转氨基作用和脱氨基作用联合一起实现的联合脱氨，迄今仍然认为是由 L-谷氨酸脱氢酶担负真正脱去氨基的作用：

氨基酸的转氨 除甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、脯氨酸外，其余氨基酸都可将自身的 α -氨基转移给酮酸，而且这个反应是可逆的。由此也说明了非必需氨基酸生物合成的途径。

转氨酶分布很广，至今已发现有 50 种以上 D-氨基酸和 L-氨基酸都有相应的转氨酶。转氨酶的辅基均为磷酸吡哆醛。转氨机理均为形成醛亚胺中间物。



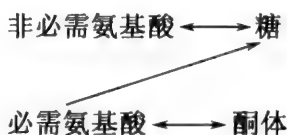
4.7.2 碳骨架的分解

20 种氨基酸的碳骨架以 5 种产物（乙酰 CoA, α -酮戊二酸、琥珀酰 CoA, 延胡索酸和草酰乙酸）进入三羧酸循环, 最后彻底氧化为 CO_2 和水。这 5 种产物均为糖代谢的中间物, 有些也是脂代谢的中间物。各种氨基酸的碳骨架并非只有彻底氧化一条路, 它们也可以再次转变为相对应的氨基酸（非必需氨基酸来源之一）, 也可以转变为糖和脂肪, 也可以转变为酮体。

10 种氨基酸（丙、苏、丝、甘、半胱、苯丙、酪、亮、赖、色）分解后形成乙酰 CoA; 5 种氨基酸（精、组、谷氨酰胺、脯、谷氨酸）形成 α -酮戊二酸; 3 种氨基酸（异亮、蛋、缬）转变为琥珀酰 CoA; 2 种氨基酸（天冬氨酸、天冬酰胺）转变为草酰乙酸。苯丙氨酸、酪氨酸又可形成延胡索酸。这样的再分解去路几乎无什么规律而言, 只能逐个了解。必须注意到, 氨基酸碳骨架的分解虽然归于以 5 种糖代谢中间物的进一步分解, 但并非 20 种氨基酸仍以分解途径逆向而合成, 因为对于人和多数动物而言, 必需氨基酸的分解途径不同于合成途径, 否则就无必需氨基酸可言了。

值得注意的是, 20 种氨基酸碳骨架进入三羧酸循环时惟独没有采用三羧酸循环中的含羟基的三种有机酸（苹果酸、柠檬酸、异柠檬酸）。因此可以说, 20 种氨基酸的碳骨架分解仅选用了三羧酸循环中的 α -酮酸和延胡索酸。另外, 虽然有 10 种氨基酸可以通过乙酰 CoA 进入糖代谢而彻底分解, 但只有其中 5 种（苯丙、酪、亮、异亮、色）直接形成乙酰 CoA, 其余要经过丙酮酸, 然后转变成乙酰 CoA。能直接形成乙酰 CoA 的 5 种氨基酸因为可形成酮体, 统称为生酮氨基酸, 它们都是必需氨基酸。

必需氨基酸、非必需氨基酸、生糖氨基酸、生酮氨基酸、生糖兼生酮氨基酸之间的关系概括为:



由此可知, 必需氨基酸的碳骨架分解不可逆。

氨基酸分解过程中可形成多种衍生物。比较重要的衍生物有一碳基、胺、肌酸、 γ -氨基丁酸、牛磺酸、吲哚乙酸、黑色素、肾上腺髓质激素等。

生物体内常见的一碳基有: 甲基 ($-\text{CH}_3$)、甲叉基 ($-\text{CH}_2-$)、次甲基 ($-\text{CH}=\text{}$)、羟甲基 ($-\text{CH}_2\text{OH}$)、甲酰基 ($-\text{CHO}$)、亚氨甲基 ($-\text{CH}=\text{NH}$)。一碳基的携带者为四氢叶酸 (FH_4)。一碳基来自甘、苏、丝、组、蛋共 5 种氨

基酸。从量上分析，丝氨酸是一碳基主要来源。一碳基是嘧啶、嘌呤、S-腺苷蛋氨酸和其他需要甲基化的物质的生物合成所必需的，这是氨基酸代谢与核苷酸代谢联系的一个主要方面。

黑色素、肾上腺髓质激素（肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴、多巴胺）是酪氨酸的衍生物。黑色素的结构式尚未正式确定。

5-羟色胺、吲哚乙酸来自色氨酸。5-羟色胺是脊椎动物的一种神经递质和血液收缩素。吲哚乙酸是一种植物生长激素。

组胺、腐胺、精胺、亚精胺、 γ -氨基丁酸和牛磺酸是相应氨基酸脱羧后的产物。组胺来自组氨酸，可引起血管舒张，且为感觉神经的一种递质。腐胺来自鸟氨酸。腐胺和一分子S-腺苷蛋氨酸中的3C和一个氨基缩合成为亚精胺，再和一分子S-腺苷蛋氨酸的3C和一种氨基缩合形成精胺。精胺和亚精胺因此有多个氨基，又名多胺。腐胺见于腐败肉中，多胺见于人的精液。 α -氨基丁酸来自谷氨酸 α -脱羧，为脑组织中抑制兴奋的神经递质。牛磺酸来半胱氨酸氧化脱羧。

4.7.3 氨基酸代谢缺陷症

氨基酸分解代谢往往是由多种酶连续作用进行的，如果某一种酶缺乏，该酶作用的底物在体内便会堆积，大量出现于血液和尿中。典型的例子有苯丙酮尿症、尿黑酸症和槭糖尿症。苯丙酮尿症是由于缺乏苯丙氨酸4-单加氧酶而引起苯丙酮酸聚积，进而引起智力迟钝。尿黑酸症是由于缺乏尿黑酸氧化酶而使尿黑酸在尿中出现。槭糖尿症是由于患者血、尿中出现大量支链氨基酸（缬、亮、异亮）及相应酮酸，产生类似槭糖的气味而得此名，患者缺乏支链氨基酸脱羧酶。

4.7.4 氨基酸的生物合成

大部分非必需氨基酸的碳骨架可重新接受氨基，这些碳骨架可由糖代谢提供补充。少数非必需氨基酸（如酪氨酸）可通过必需氨基酸（如苯丙氨酸）转化而来。氨基酸的生物合成关键是必需氨基酸的合成。

在8种必需氨基酸（苏、缬、亮、异亮、苯、色、赖、蛋）中，苯丙氨酸、色氨酸由莽草酸途径合成，起始物质为磷酸烯醇式丙酮酸和 α -磷酸赤藓糖，重要的中间物有莽草酸和分枝酸；亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸由苏氨酸、天冬氨酸和丙酮酸起步；赖氨酸合成由天冬氨酸、丙酮酸或 α -酮戊二酸起步；蛋氨酸由天冬氨酸起步，起始所需的天冬氨酸来自草酰乙酸。这样可以看出，必需氨基酸的生物合成起始物均为糖代谢中间物，分别为丙酮酸、4-磷酸赤藓糖、磷酸烯

醇式丙酮酸、 α -酮戊二酸。丙酮酸、磷酸烯醇式丙酮酸来自糖酵解途径；4-磷酸赤藓糖来自磷酸戊糖途径； α -酮戊二酸来自三羧酸循环。

必需注意到，氨基酸生物合成中组氨酸、色氨酸的生物合成过程均需要 5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸 (PRPP)，这一特点和嘌呤核苷酸生物合成相同，而且核糖中的碳原子参与了氨基酸碳骨架的形成。

4.8 蛋白质生物合成

蛋白质生物合成是遗传信息表达的终端。各种生命现象的差异直接取决于蛋白质种类的不同。蛋白质生物合成研究的内容包括以下方面：

- (1) 蛋白质生物合成的场所——核糖体。
- (2) 蛋白质生物合成的模板——mRNA。
- (3) 蛋白质生物合成的氨基酸载体——tRNA。
- (4) 蛋白质生物合成需要的酶和各种因子。
- (5) 蛋白质生物合成后的加工、运输、分泌。

目前蛋白质生物合成研究的焦点问题是：

(1) 核糖体的组成、结构和作用机理。绝大部分 rRNA 的一级结构已测知。但对绝大多数蛋白质仍不甚了解。rRNA 与各种蛋白质和各种因子之间的作用和关系有待研究。

(2) tRNA 的作用机理。一种氨基酸有多个密码子时，对密码子的选用机理了解甚少，氨酰 tRNA 合成酶如何将 tRNA 和氨基酸相互对应地连接起来、tRNA 分子中所谓的副密码子究竟是什么正在进行深入研究。

(3) 蛋白质生物合成后的加工、运输和分泌引人注目。蛋白质折叠、跨膜运输和分泌问题关系到许多实际应用问题、理论和实践意义重大。

上述问题有待研究，所以关于蛋白质生物合成的步骤仅仅还是一个大致轮廓。

在首先弄清蛋白质生物合成所需的各种条件之后，蛋白质生物合成的步骤和机制实际上等于是将这些条件逐一地利用而已。

4.8.1 核糖体

核糖体是蛋白质生物合成的场所，但不是惟一的场所。一个生长旺盛的细菌中约有 20000 个核糖体，而真核细胞内可达 10^6 个。原核生物的核糖体和 mRNA 结合在一起，真核生物的核糖体主要和内质网相连。核糖体由大、小两个亚基组成，主要成分为核糖体 RNA (rRNA) 和蛋白质。大亚基中的蛋白质用 L 表示，

如 L^{34} 表示大亚基中第 34 种蛋白质。小亚基中的蛋白质用 S 表示, 如 S^{21} 表示小亚基中第 21 种蛋白质。真核生物的核糖体比原核生物核糖体略大, 前者为 80S, 后者为 70S。这是由核糖体中 rRNA 的大小和蛋白质种类的多少差异而导致的。真核生物 rRNA 由 28S、5.8S、5S 和 18S 组成, 蛋白质已知有 82 种。原核生物 rRNA 由 23S、5S 和 16S 组成, 已知有 52 种蛋白质。真核生物线粒体、叶绿体中的核糖体大小接近原核生物, 详细的组成了解不多。

蛋白质两类组分中, 5S rRNA、大肠杆菌 5S rRNA 由 120 个核苷酸组成。一、二级结构已基本清楚。CGAAC 和 GCGCCGAAUGGUAGU 两个保守区分别与 tRNA 的 T ψ C 环上的 GT ψ CG 区和 23S rRNA 的一段序列互补, 被认为是 5S rRNA 和 tRNA 及 50S 核糖体大亚基结合的位点。真核生物 5S rRNA 不存在 CGAAC 保守序列, 另有 GAUG 序列与起始 tRNA 相作用。

16S rRNA 由 1475~1544 个核苷酸组成。少量碱基被修饰, 为 30S 亚基组分, 3'端的 ACCUCCUUA 和 mRNA 5'端翻译起始区互补, 即原核生物 mRNA 5'端起始密码子 AUG 上游的 9~13 个核苷酸 (一般认为是 AGGA), 称之为 SD 的序列。

23S rRNA 是原核生物大亚基中惟一的 rRNA, 2904 个核苷酸, 有与起始 tRNA 互补的序列。5S rRNA 和 20 余种蛋白质和 23S rRNA 结合。

5.8S rRNA 为真核生物大亚基所特有, 160 个核苷酸, 内含修饰碱基和与 5S rRNA 中保守序列 CGACC 相同的序列, 故被认为是与 tRNA 作用的识别序列。

28S rRNA 的结构不详。

rRNA 与 mRNA、tRNA 和其他 rRNA 相互作用的方式已知的仍为碱基互补, rRNA 和蛋白质如何相互作用了解甚少。赫尔 (Herr) 等新近认为大肠杆菌核糖体两个亚基之间结合主要靠 16S rRNA 和 23S rRNA 之间的碱基配对来实现。

核糖体大亚基负责氨基酸之间肽键的形成, 所以有 A 位 (AA-tRNA 结合位) 和 P 位 (肽基转移部位和形成肽键部位)。小亚基与 mRNA 结合, 负责识别起始位。密码子和反密码子相互作用。核糖体大小亚基在翻译初期是分开的。一条 mRNA 分子约 40 个核苷酸长度结合一个核糖体。核糖体上有起始因子、延伸因子、释放因子和多种酶的结合位点。

近来研究提出, 核糖体除了 A、P 两个位点外, 还有一个 E 位点即 tRNA 出口位。当肽键形成时, 原来在 P 位的空载 tRNA 并不立即从核糖体解离下来, 而是移位到 E 位上。当新的氨酰 tRNA 结合到 A 位时, 核糖体构象发生改变, 在 E 位的空载 tRNA 才解离下来。

4.8.2 tRNA

tRNA 是氨基酸进入核糖体形成肽链的载体。tRNA 的一级结构由 70~90 个核苷酸组成, 沉降系数为 4S 左右, 碱基中富含稀有碱基或核苷, 这是转录后修饰而来的。3' 端均为 CCA-OH, 用于接受氨基酸。5' 端大多为 G 或 C。各种 tRNA 的差异主要来自额外环的组成。

tRNA 的二级结构呈三叶草形。配对部分成为柄或臂, 非配对部分突起成环, 四环三臂由此而来。二氢尿嘧啶环由 8~12 个核苷酸组成, 具有两个二氢尿嘧啶, 此环以二氢尿嘧啶臂和其余 tRNA 部分相连。反密码环由 7 个核苷酸组成, 环中有反密码子, 与此环相连的双螺旋区叫反密码臂。T ψ C 环由 7 个核苷酸组成, 因均含 T ψ C 而名, 与此环相连的臂叫做 T ψ C 臂。 ψ 不是稀有碱基而是稀有核苷, 因为 ψ 中的糖环和碱基 U 以 1—5 相连而非 1—1, 故称假尿苷。额外环的组成在 3~18 核苷酸之间。

tRNA 的三级结构呈倒 L 形, 氨基酸臂、T ψ C 臂组成 L 的底部, 反密码环、反密码臂、二氢尿嘧啶臂、额外环 T ψ C 环形成了 L 的其余部分。反密码子和氨基酸臂处于 L 的上下两个顶点。

tRNA 的分类除了按每种氨基酸对应的 tRNA 划分外, 还因 tRNA 具有的其他功能而另有分类。同工 tRNA 是指携带同一种氨基酸的全部 tRNA 的总称。反义 tRNA 的反密码子各不相同, 但均能和同一氨基酸密码子相识别。校正 tRNA 具有校正 mRNA 中密码子的作用。这种校正不是直接改变 mRNA, 而是靠 tRNA 自身的反密码子改变、而携带的氨基酸不变来实现的。比如大肠杆菌色氨酸合成酶基因的琥珀突变使其 mRNA 起始密码子亮氨酸密码子 UUG 变成了琥珀密码子 UAG, 因而不能合成色氨酸合成酶, 但校正 tRNA^{leu} 反密码子已从 3'-AAC-5' 变成了 3'-AUG-5', 仍能将亮氨酸加上去。

tRNA 的选择使用是由于一种氨基酸有不只一种 tRNA, 这些 tRNA 的反密码子是相同的。在多种 tRNA 中, 为了加入一种氨基酸, 每种生物究竟选用哪一种 tRNA, 这是一个翻译调控的机理问题, 这个问题有待研究。

近年来发现 tRNA 尚有一些其他功能。如谷氨酰 tRNA 和叶绿素的生物合成有关; 含硒的 tRNA 可以促进 mRNA 的翻译; 反转录病毒在反转录时需要 tRNA 为引物, 在蛋白质 N 端加一个氨基酸残基; 合成氨酰磷酸酯酰甘油; 依赖泛酸的动物蛋白质降解需要氨酰 tRNA; 合成脂多糖; 合成细菌细胞壁; 含硒氨基酸的合成以及含硒蛋白质的生物合成需要特殊的以 AUG 为密码子的 tRNA 等。

4.8.3 mRNA

mRNA 是蛋白质生物合成的直接模板。原核生物及病毒的 mRNA 为多个肽链或蛋白质同时编码在一条 mRNA 分子上,真核生物则只能编码一个多肽。由于各种蛋白质分子量相差很大,mRNA 分子大小各异可想而知。细菌 mRNA 的半衰期较短。由于一个细胞内同时会有多种 mRNA 存在,翻译时选用哪一种 mRNA 必然有一种机制,这个问题了解甚少。mRNA 分子中编码的信息除了多肽链之外,还有负责调节翻译的信息。原核生物 mRNA 的起始码 AUG 上游 9~13 的 SD 序列和 16S rRNA 特定序列结合,真核生物 mRNA 有转录后添加的 5' 帽子和 3' poly A 尾,均对翻译有调节作用。细菌 mRNA 常以 AUG 作为起始码。真核生物绝大部分也以 AUG 作为起始码。原核生物 mRNA 分子内各个多肽链编码区的关系如何了解甚少。真核生物和原核生物 mRNA 均可在真核细胞和原核细胞中被翻译这一事实,不仅证实了密码子的通用性,而且也说明了非编码区也有一定共性。

遗传密码主要是用无细胞体系和化学方法合成 mRNA 技术证实的。1961 年 Nirenberg 等用 polyU 加无细胞体系证实了 UUU 为 Phe 的密码子。之后又用随机共聚物找到了 20 种氨基酸密码子。用特定序列共聚物为模板证实了遗传密码的不重叠、无标点等特性。核糖体结合技术进一步证实了遗传密码的存在和特性。遗传密码子是三联体式的。共有 61 个氨基酸密码子;UAA、UGA、UAG 3 个终止码,分别命名为赭石、琥珀和蛋白石密码;起始码为 AUG 和 GUG,同时又是甲硫氨酸和缬氨酸的密码子。生物为什么将起始码和两种氨基酸密码子共用尚不清楚。线粒体中有例外,UGA 为色氨酸的密码子,AGA、AGG 不是精氨酸的密码子,而是终止码。线粒体的终止码达 4 个。甲硫氨酸密码子有两个(AUG、AUA),起始甲硫氨酸密码子有 4 个(AUA、AUG、AUC、AUU)。酵母线粒体、支原体、嗜热四膜虫等还有例外。由此说明,遗传密码的通用性不是绝对的。关于 mRNA 分子中的三联体密码之间无逗号,近年来发现也有例外,某些情况下翻译过程可以发生跳跃,从而导致某些区域不能被翻译。mRNA 是从 DNA 转录而来的,mRNA 分子的序列在转录后加工中的编辑现象的发现,更是对生物中心法则的冲击。

遗传密码具有简并性,即一种氨基酸具有一种以上的密码子。一个氨基酸有多于一种的 tRNA 与其相对应,一个 tRNA 分子可识别一个以上的密码子。密码子第三位可以错配,意味着反密码子第一位可以随之变动,这种密码子和反密码子配对的摆动早已为人们发现,但其机理是什么仍不清楚。初步认为,tRNA 分子中另有一套密码子(副密码子),tRNA 和哪种氨基酸相连取决于 AA-tRNA

合成酶和副密码子的相互作用，也就是说，tRNA 携带哪种氨基酸，主要是由 tRNA 分子中的副密码子决定的。

已知蛋白质生物合成因子有 3 大类：起始因子、延伸因子和终止因子。这些因子本质上也是蛋白质。3 类因子在原核生物和真核生物中的种类和组成不同。

4.8.4 起始因子

起始因子是协助蛋白质生物合成起始的因子。蛋白质生物合成起始阶段的完成以核糖体大小亚基、mRNA 和 fMet-tRNA^{Met} (Met-tRNA_i) 形成复合物作为标志。参与这一复合物形成的各种因子均为起始因子。已知原核生物有 3 种起始因子 (IF₁、IF₂、IF₃)。真核生物有十余种起始因子 (eIF₁、eIF₂ 等)。IF₂ 的功能是通过生成 IF₂·GMP·fMet-tRNA 三元复合体，使起始 tRNA 特异性地与 30S 亚基结合。IF₂ 同时具有 GTP 水解酶活性。IF₃ 的功能是使 30S 亚基特异性地与 mRNA 起始位点相结合，并且使核糖体大、小亚基保持解离状态。IF₁ 有稳定起始复合物的作用。eIF₂ 与 GTP 和 Met-tRNA 生成三元复合物，类似于 IF₂。eIF₃ 使大、小亚基保持分离，类似于 IF₃。eIF₄B 能够扫描识别 mRNA 的起始密码子，eIF₄E 和 eIF₄F 与 mRNA 5' 帽子识别有关。

4.8.5 延伸因子

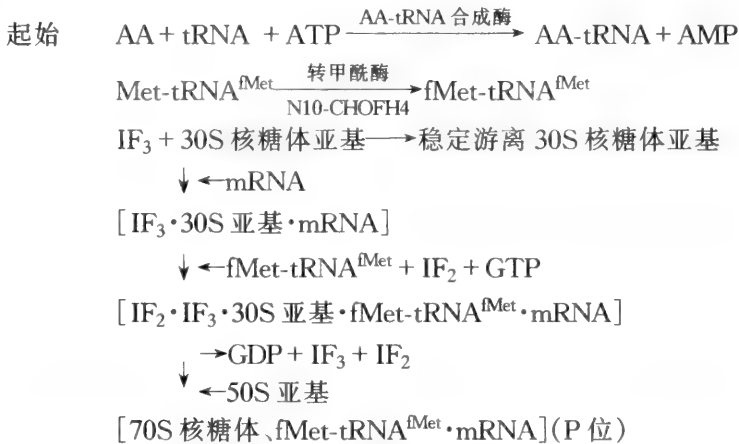
参与肽链延长的因子称为延伸因子，原核生物有 3 种延伸因子 (EF-Tu、EF-Ts、EF-G)。EF-Tu 对热不稳定，通过与 GTP 和 AA-tRNA 结合，将 AA-tRNA 带入核糖体 A 位并同 mRNA 相结合。EF-Ts 对热稳定，可使 EF-Tu·GDP 再成为有活性的 EF-Tu 和 GTP，再次参与肽链延伸。EF-G 使肽基 tRNA 从核糖体 A 位移向 P 位。真核生物延伸因子已知有两种 (EF-1、EF-2)。EF-1 相当于 EF-Tu，EF-2 相当于 EFG。

4.8.6 终止因子

识别终止码的因子为终止因子。原核生物有两种终止因子 (RF₁、RF₂)。RF₁ 识别 UAA 和 UAG，RF₂ 识别 UAA 和 UGA。真核生物有两种终止因子 (eRF₁、eRF₂)。eRF₁ 能识别 3 个终止密码子 UAA、UAG 和 UGA，eRF₂ 的具体作用有待进一步确定。

4.8.7 蛋白质生物合成的步骤

核糖体上进行的蛋白质生物合成分为起始、延伸和终止 3 个阶段。这 3 个阶段，除了核糖体组成、各种因子、起始 tRNA 不同外，其余环节在真核生物和原核生物中十分类似。只要了解了原核生物蛋白质生物合成 3 个阶段，真核生物蛋白质生物合成只需找出不同点即可。真核生物蛋白质生物合成的知识来自离体研究。



氨基酸活化在核糖体外进行。氨基酸活化时 ATP 水解成 AMP，相当于消耗 2 分子 ATP。起始过程仅需要 $fMet-tRNA^{fMet}$ ，形成的 70S 起始复合物是起始完成的标志。起始过程需要 GTP。

延伸 延伸包括 AA-tRNA 与核糖体结合、肽键生成、移位 3 个阶段。



E 位点的-tRNA 离开核糖体

AA-tRNA、EF-Tu 和 GTP 形成复合物后进入核糖体 A 位。EF·Tu·GDP 可重复再生成 EF-Tu·GTP。A 位 AA 的 α -氨基和 P 位的 fMet 的 α -羧基形成肽键后，P 位被 tRNA 肽基占据，原来 A 位上的 tRNA 移向 E 位后再离开核糖体重复使用。当 A 位空位时又可接受下一个 AA-tRNA。移位的过程相当于 mRNA 向 5' 端方向移动或相当于核糖体向 mRNA 的 3' 端方向移动了一个三联体密码子的长度。目前认为是核糖体在 mRNA 分子上移动。

蛋白质生物合成中 mRNA 被翻译的方向是 5'→3'；蛋白质合成的方向是从 N 端向 C 端；原核生物蛋白质生物合成时 N 端均为 fMet，后经过加工才有了各种 N 端残基；蛋白质生物合成延伸所需的能量供体为 GTP。

终止 核糖体沿 mRNA 移动，当 A 位点出现终止码时，释放因子直接结合到终止码上而使 AA-tRNA 不能与其结合，此时 P 位上的多肽链与 tRNA 的连接键被水解，新生肽链被释放。

真核生物蛋白质生物合成已知有以下不同点：

- (1) 起始 AA-tRNA 为 Met-tRNA。
- (2) 40S 亚基首先识别 mRNA 5' 端，然后移动到起始位点（原核生物起始复合物直接在 AUG 处形成）。
- (3) 小亚基不首先与 mRNA 结合。
- (4) 核糖体各种因子不同于原核生物。

4.8.8 翻译后加工

翻译后加工包括以下几部分：

- (1) N 端的 fMet 或 Met 的切除。
- (2) 二硫键的形成。
- (3) 修饰作用，即磷酸化、糖基化、甲基化、乙基化、羟基化等。这是存在于蛋白质中的氨基酸残基种类数不等于 20 的主要原因。
- (4) 切除非必需片段，如胰岛素信号肽的切除、C 肽的切除等。
- (5) 剪接。已知 RNA 有自剪接，新近发现蛋白质同样也有自剪接，蛋白质自剪接被切除的是蛋白质内含子，相互拼接的是蛋白质外显子，如酵母 H^+ -ATP 酶的 69kD 亚基。蛋白质内含子不同于 RNA 水平剪接所指的内含子，前者是指蛋白质，后者是指核酸。

4.8.9 蛋白质的转运

合成的蛋白质有两种转运结果：一是离开核糖体，进入细胞内其他区域，这是膜内转运；另外一种是不离开核糖体，还要离开原来合成这种蛋白质的细胞，进入到细胞外其他部位，这是一种跨膜转运。根据翻译和转运是否同步进行，又可划分为翻译转运同步和翻译后离开核糖体再转运的翻译后转运。分泌蛋白属于翻译和转运同步进行。在细胞发育过程中，蛋白质是以翻译后转运进行的。参与生物膜形成的蛋白质，介于前两种之间。不论哪一种转运，合成后的蛋白质跨膜转运是最基本的转运。蛋白质在细胞内、细胞间、细胞和细胞外液间都有一个跨膜的过程。

目前对分泌蛋白质的转运主要以“信号肽理论”来解释。翻译后在细胞内的同步转运是以“前导肽理论”来解释的。

信号肽为能启动蛋白质转运的任何一段肽段。免疫球蛋白(IgG)轻链、胰岛素等分泌蛋白质前体中都发现有由 mRNA 编码的一段肽段，在分泌蛋白质转运完成后即被降解。已知的各种信号肽一级结构很少有进化上的保守性。

前导肽与翻译后转运有关，处于待转运的蛋白质 N 端，含 20~80 个氨基酸残基，在转运完成后被水解。前导肽富含带正电荷的氨基酸（特别是精氨酸）和带羟基的氨基酸（特别是丝氨酸），有形成亲水又疏水的双亲 α 螺旋结构的能力。前导肽已见于细胞色素 cI、细胞色素氧化酶 IV 亚单位等。

甘露糖-6-磷酸已被证实是在高尔基体中合成的糖蛋白转运到溶酶体内的一种信号，甘露糖-6-磷酸处于糖蛋白的糖链末端。

蛋白质的跨膜运输机理研究已经深入到仔细研究信号肽、前导肽等转运导向物质的一级结构和此次结构与膜结构关系的水平，如前导肽的双亲 α 螺旋与蛋白质折叠和跨膜时构象变化的研究。

4.8.10 寡肽的生物合成

近年来，越来越多的寡肽被发现。由于大多数寡肽已被证实有各自的生物活性，故又称为活性肽。已分离并应用的寡肽可分为 3 大类：第一类为激素类，如催产素、加压素、舒缓激肽；第二类为抗生素，如短杆菌肽 S、多粘菌素 E、放线菌素 D；第三类为具有其他活性的活性肽，如脑啡肽 P 物质、细胞素、免疫多肽、内皮素、谷胱甘肽、 α -鹅膏蕈碱、肌肽等，以神经肽为主。

寡肽与细胞分化、免疫、应急、肿瘤、衰老、生殖、生物钟、分子进化都有重要联系。在理论和应用上意义重大。

寡肽的结构特点是分子量小，一般由两个到几十个氨基酸残基组成，有的内含 D-氨基酸，有的内含非 α -氨基或羧基形成的肽键，少数为环状，有的内含非氨基酸成分。

寡肽的生物合成已知有两种途径：一种如同蛋白质一样是在核糖体上合成；一种是由多酶体系，如同脂肪酸那样合成的。已知寡肽内的 D-氨基酸首先是以 L-氨基酸作为底物，然后变旋成为 D-氨基酸的。15 个氨基酸残基以下的寡肽几乎都是以多酶体系方式合成的，其中以短杆菌肽 S 的合成研究最为详细。

短杆菌肽 S 为环状 10 肽，分两部分以 5 肽方式合成后再头尾相连，故呈环内对称结构，内含 2 个 D-苯丙氨酸残基：

D-苯丙—脯—缬—鸟—亮—D-苯丙—脯—缬—鸟—亮

催化短杆菌肽 S 合成的酶系有两个组分，第一组分有 4 个巯基和一个 4'-磷酸泛酰巯基乙胺长臂辅基，和脂肪酸生物合成中 ACP 相似。第一组分能使除 D-苯丙氨酸外的 4 个残基依次相连成 4 肽，然后和第二组分上的 D-苯丙氨酸相连成 5 肽。两个 5 肽相连成 10 肽也是在第一组分上进行的。

寡肽在多酶体系上而非在核糖体上合成，说明了自然界肽类化合物的生物合成并非单一途径。由此也进一步说明 DNA 分子中的遗传信息并非能统揽所有肽类化合物的合成。但是也必须明白，寡肽合成所需的酶仍然受 DNA 信息支配，这是一种肽类化合物生物合成部分而非全部直接由 DNA 控制的例证。控制并不意味着完全决定。

天然寡肽量少，且难提纯。目前寡肽的体外合成主要用化学方法进行。

4.8.11 蛋白质折叠

随着蛋白质一级结构数据的积累，从理论上揭示蛋白质一级结构与空间结构的关系规律已经受到全世界的关注。自从安芬森（Anfinsen）通过对核糖核酸酶 A 变性后可自发复原成天然结构的研究而提出一级结构决定高级结构论断并因此获得诺贝尔奖以来，人们一直在用各种方法研究这一问题。但时隔 20 年，面对约 90000 个已知序列的蛋白质，人们仍然没有找到一种理想的预测方法。近年来蛋白质人工设计新型蛋白质分子的工作更加需要加速蛋白质折叠的研究。

对于一个由几十到数百个残基组成的蛋白质，合成时仅需要 20 种氨基酸，每一种蛋白质且并非都含有 20 种残基，排列的规律看似简单。但几十年的研究表明，这一问题甚为复杂。在蛋白质二级结构预测方法中，目前以 Chou-Fasman 方法、Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR) 方法和 Lim 方法最为常用。

Chou-Fasman 方法是在 1974、1978、1979 年对 15、29、64 种已知结构的蛋白质进行统计处理，得出 20 种氨基酸在 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角中的分布频率，

然后反过来利用这些参数预测未知结构蛋白质的二级结构,此方法简单明了,容易用计算机程序来实现,预测率可达到 50% 左右。

GOR 方法是以信息论为基础的,因而本质上仍属于统计学方法。此方法和 Chou-Fasman 方法相比,不仅考虑被预测位置本身氨基酸残基种类的影响,而且考虑了前后各 8 个氨基酸残基对该位置构象的影响。最初的 GOR 方法只考虑了单个残基的影响,假设各残基是相互独立的,近来又考虑了残基对的相互作用,预测成功率提高到 63% 左右。GOR 方法物理意义清楚明确,数学上比较严格,容易写出计算机程序,缺点是表达式复杂。

Lim 方法是物理化学方法。以残基的亲、疏水性,带电性及体积大小对 20 种氨基酸进行分类。此方法之一是用二进制的 1 和 0 对疏水和亲水氨基酸进行赋值,并以 8 个残基为一组,由此可得到 8 个二进制,然后再将每组为 8 个残基的二进制数转换为十进制,从中可以得知哪些十进制数为螺旋,哪些为 β 片层,哪些为转角。对于长度小于 50 个残基的蛋白质,其预测准确率高达 73%。此方法是 3 种方法中预测率最高的。

现在,神经网络方法也已用于蛋白质二级结构预测。目前用于二级结构预测的网络模型大多为 BP 网络,即反向传播学习算法。

20 余年的研究,为什么二级结构预测成功率仍不能满足蛋白质三维结构预测的要求,这一问题的原因何在尚不清楚。目前亟需解决的理论问题是:蛋白质二级结构是否主要取决于邻近氨基酸残基间的短程相互作用;目前的蛋白质数据库是否可以提供足够的信息;目前的预测方法是否已成功地提取了现有所有信息。分子伴侣的发现使这一问题节外生枝。遗传信息流的方向和流动的信息修改加工如何考虑和可否从核酸而不是从蛋白质直接提取信息的问题已开始有人考虑。

人们已知有些蛋白质的复性效率并非有核糖核酸 A 那样高,特别是有些通过 DNA 重组技术获得的表达产物在折叠过程中很不理想,因此有人开始怀疑 Anfinsen 的一级结构决定高级结构的理论。英国的 Laskey 发现并命名的分子伴侣使蛋白质折叠问题有了一个新的内容。分子伴侣首先发现于组蛋白和 DNA 在体外生理离子强度条件下的重组过程,这一重组过程需要一种酸性蛋白,它和组蛋白结合后促进组蛋白和 DNA 组装。植物叶绿体的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶—加氧酶的大小各 8 个亚基也必须首先和一种蛋白质结合后才能在体内正确组装成有活性的酶。热休克蛋白的作用也证实了蛋白质折叠时需要协助。

折叠酶是另一种帮助蛋白质折叠的蛋白质。已知的蛋白质二硫键异构酶、肽基脯氨酰顺反异构酶属于折叠酶。前者催化二硫键的生成,后者催化脯氨酸亚氨基酸键由反式向顺式转变,以利于肽链折叠。目前认为蛋白质二硫键异构酶也是一种分子伴侣。

分子伴侣、折叠酶与 Anfinsen 的提出的理论似乎有矛盾，但至今科学家仍将一级结构决定高级结构理论作为蛋白质结构预测的基石，而认为分子伴侣和折叠酶的作用是一种补充。

20 种氨基酸的排列是由 4 种核苷酸首先在核酸分子中决定的。蛋白质分子的排列信息无疑在核酸中也能找到。4 种核苷酸的排列和 20 种氨基酸的排列之间的关系无疑会提供新的蛋白质折叠信息。在核酸中的一种排列信息转移到蛋白质中是一种放大的过程。如果能将核酸和蛋白质的残基排序统一起来，有可能帮助人们认识蛋白质折叠的机理，基于这样一种考虑，作者联想到核酸和蛋白质的二级结构都以氢键为主要化学键，在核酸中碱基配对通过氢键，密码子和反密码子识别通过氢键，蛋白质形成二级结构时肽键之间有氢键，氢键贯串于遗传信息流的全过程。那么氢键是否也传递某种信息，或者说，氢键是否是一种信息键呢？为此，作者做了如下的研究。

根据遗传密码表，在三联体密码子中，20 种氨基酸的密码子可根据密码子中间位的碱基能够形成两个还是三个氢键（正常情况下）进行划分。凡是中间位碱基能形成两个氢键的有甘、丙、丝、苏、半胱、精、色、脯，其余 12 种密码子中间位碱基能形成三个氢键，这等于第一类氨基酸的密码子中间位碱基为 C/G，第二类氨基酸的密码子中间位碱基为 A/U。这样的氨基酸分类方法既不同于化学，也不同于物理分类方法，而是根据核酸和蛋白质之间的信息传递——密码子和反密码子配对来划分。

将上述二类氨基酸划分方法用于分析蛋白质数据库中的各种蛋白质一级结构，看看这种划分后的残基是否具有类聚性（即是否倾向在一起排列）、类聚后形成了哪些二级结构、类聚时的长度、类聚的分布特点、类聚时组合特点等。在分析了近百种蛋白质一级结构之后，可以完全肯定，这样划分后的氨基酸在一级结构中类聚是普遍的。第一类氨基酸（A、G、C、T、P、R、S、W）类聚时（3 个以上连续集中排列），极易形成转角及非 β 、非 α 二级结构。第二类氨基酸（D、E、F、I、K、L、N、Q、V、H、Y、M）类聚时极易形成 α 和 β 二级结构。两类氨基酸杂聚时以 α 螺旋结构为主。用这样的方法预测二级结构，最大的障碍是对 α 和 β 结构特别是 β 结构的区别。究竟是什么样的残基序列容易形成 β 结构问题是迄今各种预测方法的共同难点，为此美国数所大学和研究机构不惜重金，用化学合成的方法，对世界公认的几种倾向于形成 β 结构的氨基酸残基进行肽键连接，从根本上寻求 β 结构形成的机理。

用氢键数的方法不仅可以从蛋白质一级结构预测二级结构，更重要的是可返回到核酸分子数据库中，从核苷酸顺序预测蛋白质二级结构，这一工作正在进行之中。

在实际分析中，发现氨基酸残基对之间确有相互作用，类似于遗传学上的

显、隐性基因的相互作用。大量迹象表明,处于肽链中的氨基酸残基性质已大大不同于单独存在时的性质。一个蛋白质分子为什么需要一定链长的肽链,这不仅是对某个R基的需要,更重要的是每个残基对整个分子链的贡献。所有的残基是一个分子整体,当一个蛋白质分子的全部残基按一定顺序排列起来并形成特定空间结构时,便会产生整体效应。这种整体效应如果出现在氨基酸残基排列过程之中,那就是空间结构产生的基础。这样的整体效应究竟是什么?是一种力?是一种能量?还是一种迄今还不知道的东西?有待于人们进一步研究。生命大分子的链状结构不同于纯化学高分子,聚氯乙烯是氯乙烯的单调聚合,聚乙烯是乙烯的简单聚合,这样的聚合物形成之后产生了比单体高得多的机械强度,用来做塑料制品。而生命大分子的组分至少有4种(核酸),最多有20种(蛋白质),显然已不能用机械强度来解释。

由于二级结构预测尚未根本解决,整个空间结构预测无疑受到制约。目前的预测方法有3类:①理论计算预测;②根据结构类型预测;③根据蛋白质同源性预测。第一类方法的核心是能量最小构象假说。此类方法现在主要用作其他方法的辅助方法。蛋白质一级结构有同源性,三级结构也有同源性,而且高于前者。用同源性预测蛋白质二级和三级结构,要求首先每个家族中至少有一个成员结构已知。现在距离完成每个家族中至少有一个成员结构被测定还有很长时间,已知有600多个家族,但只发现了300多种结构类型。对三级结构同源性的判定比一级结构同源性判定要困难得多。所以后二类方法目前也是在继续探索之中。在空间结构预测中成功的例子是1987年Per和Taylon对HIV病毒蛋白酶结构的预测。HIV病毒蛋白酶能将病毒编码的多聚蛋白水解成有活性蛋白,此酶有天冬氨酸蛋白酶家族中共有的保守活性中心:Asp—Thr—Gly。由此推测此酶有两个结构近似的对称结构域,为二聚体。由此经计算机设计出该酶的抑制剂进而达到抗艾滋病目的。

经过30余年研究,关于蛋白质折叠机理问题,获得的初步认识有:

(1) 蛋白质一级结构决定空间结构不是绝对的。一种一级结构可以有两种以上的空间结构。

(2) 蛋白质有同源性。一级结构位点氨基酸残基相同比例在25%~30%的叫做同源蛋白。

(3) 蛋白质空间结构类型的数目是有限的。在不同蛋白质中有局部空间结构构成模块的相似性。空间结构类似的蛋白质组成蛋白质家族。

(4) 拓扑学研究表明蛋白质多肽链主链对多肽链的折叠贡献比侧链大。

4.9 酶

在机能性蛋白质中，酶是其中最主要的一类。1983 年以前的近一个世纪中，酶被认为是具有催化作用的蛋白质。这是历经巴斯德认为发酵是酵母细胞生命活动的结果、Buchner 兄弟在 20 年后又证明了发酵并非要完整活细胞、30 年后美国科学家 Sumner 终于证实了酶的本质是蛋白质的长期研究之后才得以决定的。本世纪 80 年代 Cech 进而发现 RNA 也有酶活性，使酶的本质扩大化。今后酶的本质是否仍会有新发现，例如多糖和脂是否也有酶活性有待研究。酶的本质不限于蛋白质已是毫无疑问了。

4.9.1 酶的作用特点

和化学催化剂相比，酶具有高效、高度专一性、活性可调节等特点。其中以酶的专一性受到人们高度关注。酶对化学键、对化学基团、对化学基团在空间的分布位置，甚至对同一分子中碳原子来源新与旧都可做出选择。这种选择性是普通化学催化剂至今无法相比和实现的。酶处于生物细胞中或细胞之间，在生理条件下作用，且效率极高，已是化学工业模拟的主要对象。关于酶活性有调控的特点，早已引起关注。酶的量、酶的半衰期、酶的活性都是可控制的。酶水平的调控是代谢调控的基本方式。

从生物化学来说，某种生物有或无某种生物化学反应，首先是由于有或无某种酶决定的。从遗传学说来，是由于有无这种酶的基因。分子生物学既从酶，也从基因水平研究酶促反应。有某种酶的基因不一定就有某种酶，因为生物合成的酶同样有一个后加工、运输等问题。酶催化的底物有时并不和含有这种酶的细胞、细胞器在一起。

4.9.2 酶的结构特点

有催化活性的蛋白质或 RNA 在结构上必然有与一般蛋白质和 RNA 不同的结构。本质为蛋白质的酶已知有单纯和结合两类，前者仅由蛋白质组成，后者另有小分子有机物（如维生素辅基）和金属离子。结合型的酶分子蛋白质部分决定酶的专一性、抗原能力，辅基部分决定此酶催化的反应性质，如氧化还原反应、基团转移反应等。

目前，对已知本质为蛋白质的酶的结构特点的研究，主要是对活性中心残基的认识。空间结构的研究还很有限。与酶活性直接相关的氨基酸残基组成的催化

中心叫做酶的活性中心。这些残基在一级结构可不相邻而在空间结构上靠近。这些残基中与催化活性密切相关的基团叫做必需基团。目前发现的必需基团主要的有丝氨酸的羟基, 天冬氨酸、谷氨酸的末端羧基, 组氨酸的咪唑基, 半胱氨酸的巯基, 甘氨酸的 R 基 (氢)。现有的各种酶促作用机理学说中, 以广义酸碱催化和共价催化学说了解最多。二者均以羟基、羧基和巯基的可逆解离释放 H^+ 或电子为核心, 由此人们将蛋白质水解酶类分为几个大家族。第一家族为丝氨酸蛋白酶类, 这些酶的活性中心有丝氨酸和锌离子, 如胰脏分泌出来的胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶; 第二家族为含硫的蛋白酶类, 这些酶的活性中心有半胱氨酸, 如木瓜蛋白酶; 第三家族为含羧基的蛋白水解酶类, 如胃蛋白酶。

在对酶分子中氨基酸残基的特点进行研究的同时, 人们对酶分子作用时的空间结构特点也进行了初步研究, 已知的结果以“形变”为主。形变就是酶分子的构象变化, 即变构。在酶和底物接触和作用过程中, 酶的构象是变化的, 构象变化带来了酶和底物的识别和酶对底物分子原有化学键的松动。由于酶分子构象变化的可逆性, 所以这种因“形变”带来的催化可重复产生。

酶分子构象变化的起因不限于底物, 各种酶活性的其他调节物如产物也可引起酶构象改变。酶构象改变的结果有两种, 一种是使酶活性增强, 一种是使酶活性下降。别构酶或曰变构酶的活性调节即是如此。酶作用时空间结构的特点以变构酶研究最有代表性。

酶原转变为酶的研究结果说明了酶的一级结构与空间结构的关系。去掉几个到几十个残基, 酶催化所需的结构才可形成, 酶原生物合成和酶原转变成酶的过程一般不在同一组织、细胞或细胞器中进行。

酶活性部位的柔性说明了酶构象的变化不限于寡聚酶, 由一条肽链组成的酶的构象也在不断地变化着。酶的活性部位与底物过渡态中间物有互补关系。

本质为核酸的酶的结构特点了解得还很有限。已发现的数十种有酶活性的 RNA 在一级结构中都有进化上高度保守的序列, 而且这些序列与催化活性相关。大多数已知具有自我剪切活力的 RNA 都能形成“锤头”状或“发夹”式的二级结构。

已知的有酶活性的 RNA 作用的底物仅限于 tRNA、rRNA、卫星 RNA。而本质为蛋白质的酶不仅催化蛋白质, 而且催化糖、脂、核酸等多种底物。

4.9.3 酶促反应的动力学

酶促反应速度的表示和影响酶促反应的因素问题归于动力学研究。实验证实了底物浓度与酶反应速度的关系呈双曲线。这里一定要注意, 并非所有的酶具有这一特点。例如多数变构酶呈 S 型曲线。双曲线的特点告诉人们许多问题: 第一

是酶促反应速度的表示要用初速度,因为酶促反应全过程并非全部符合一级反应(这里限于单底物反应),只是反应刚刚开始时呈现一级反应;第二是酶与底物相互作用的数量关系。一个酶分子每次结合底物的分子数是一定的,因为一个酶分子有多少个活性中心是一定的,如果所有的酶的活性中心全被底物分子占据,再增加底物也无助于反应速度。所以酶促反应速度有最大反应速度,即底物增加而反应速度不增加时的速度。第三是暗示了酶和底物相互作用时形成中间产物。由此提出了中间产物学说,米氏公式的理论依据即中间产物学说。

在生物化学发展史上,用数学方法说明和证实一种理论并不多见。米氏公式成为一个范例。一般的理论通常采用实验方法来证实。

米氏公式的建立是依据中间产物学说提出的若干假设。离开和不理解这些假设,就谈不上什么理解米氏公式。米氏公式有多种推导方法,但这些假设是一致的,根据中间产物学说有:



因酶促反应速度用初速度表示,即 $ES \rightarrow E + P$ 可忽略,因此有:

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1([E] - [ES])[S] \quad (2)$$

$[E] - [ES]$ 为游离态酶的浓度。上式为 ES 形成的速度,而 ES 分解的速度为:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = K_2[ES] - K_3[ES] \quad (3)$$

恒态时,即 ES 形成和分解的速度相等时有:

$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{-d[ES]}{dt} \quad (4)$$

$$K_1([E] - [ES])[S] = K_2[ES] + K_3[ES]$$

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]}$$

令 $K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$, 得:

$$K_m = \frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} \quad (5)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

因为酶促反应初速度与 ES 形成量成正比,所以

$$V_{\max} = K_3[ES] \quad (6)$$

将⑤代入⑥得

$$V_{\max} = K_3 \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

如果所有的酶都转变成 ES, 即 $[E] = [ES]$, 此时酶促反应速度最大,

$$V_{\max} = K_3[ES] = K_3[E] \quad (8)$$

⑦除以⑧得

$$\begin{aligned} \frac{V}{V_{\max}} &= K_3 \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \frac{1}{K_3[E]} \\ \frac{V}{V_{\max}} &= \frac{[S]}{K_m + [S]} \\ V &= \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (9) \end{aligned}$$

此式即米氏公式, K_m 称为米氏常数。米氏公式表明了单底物酶促反应中酶促反应速度与底物浓度之间的定量关系, 是对中间产物学说的数学证明。在以后的应用中进一步证实了这一公式的正确性。米氏公式提供了酶的一个非常重要的参数—— K_m 值, 当酶促反应初速度达到最大反应速度一半时, 即 $V = V_{\max}/2$ 时有:

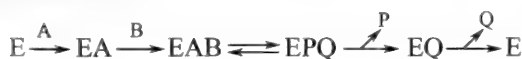
$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

$K_m = [S]$, 即 K_m 值的物理意义是当酶促反应初速度达到最大反应速度一半时的底物浓度, 其单位和底物浓度单位一样。一种酶对应一种底物只有一个 K_m 值, 所以 K_m 值是酶的特征常数, 它与酶浓度无关, 只与酶性质和底物有关, 在一定的 pH、温度条件下, 成为鉴别酶的一种手段。由于米氏公式定义 $K_m = (K_2 + K_3)/K_1$, K_m 是 ES 分解和形成速度的比值, K_m 愈小, 说明酶与该底物亲合力愈大, 反应速度也愈大。如果将米氏公式两端上下颠倒后可得到:

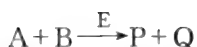
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

若以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图, 可得到一条直线, 该直线的斜率即 K_m/V_{\max} 。外推至横轴相交处得 $(-x)$, 即为 $1/K_m$ 值, $K_m = -1/x$ 。

米氏公式说明了单底物酶促反应中底物浓度和反应速度的关系。对于一种以上底物的酶促反应, 如双底物、三底物反应, 米氏公式必须要修改。这一修改的前提条件是要建立或提出一种机理, 把中间物学说扩大到多底物反应。这一工作至今少有公认研究结果。迄今仅对双底物酶促反应的机理有初步的认识, 提出 3 种反应机理——依次反应机理、随机反应机理和乒乓反应机理。依次反应机理认为酶依次有序地和两种底物反应:



总反应:



随机机理的随机性在于酶和两种底物结合的随机性和释放出产物顺序的随机性。即酶与哪种底物首先结合和作用是随机的。随机机理和依次机理的共同点在于均形成酶和两种底物在一起的三元复合物。乒乓机理说明了酶首先与底物之一结合并释放出第一种产物，此时酶的状态（组分和构象）也发生变化，然后再和第二种底物结合并作用，释放出第二种底物的产物后酶又恢复原态。这等于是酶在两种底物之间穿梭作用。故名乒乓反应机理。由于这三种机理都有各自的例证，所以都有可能存在，究竟哪一种正确或是否都能成立仍有待研究。它们的动力学公式仅在酶学专论中才涉及。普通生物化学目前仅仅要求了解这些概念即可。

4.9.4 抑制剂作用动力学

许多物质可使酶活性下降而并不导致酶变性，这就是酶的抑制剂。抑制剂作用有可逆和不可逆之别，其中以可逆抑制最为重要。这是因为可逆抑制作用在理论和实际应用中意义重大。酶活性中心残基的研究，抗菌药物、抗病毒药物的研制常以可逆抑制作用原理为依据。可逆抑制有竞争、非竞争、反竞争 3 种类型，其中以竞争性抑制研究的最多。竞争是指抑制剂和底物同酶结合时的竞争，竞争性抑制剂的结构和底物类同。酶自身没有足够的区分竞争性抑制剂和底物的能力。只以当竞争性抑制剂被结合后不能使其转化为正常产物的方式来区分。竞争性抑制剂和正常底物不但结构类似，而且在酶的同部位（活性中心）和酶结合。非竞争性抑制剂和正常底物在结构上不相类似，且和正常底物不在酶的同部位结合，所以酶同时和二者相结合，中间产物是三元复合物，同样也无正常产物生成。反竞争性抑制剂是在酶和底物结合之后才同酶结合的，形成的三元复合物也不能形成正常产物。

由于抑制剂作用的动力学公式是修改后的米氏公式，单靠推导或记忆不可取，简便的方法是要真正弄懂上述分析。三种竞争性抑制作用的共同特点是酶促反应初速度下降。下降的原因是 K_m 和 V_{max} 值的变化所致。竞争性抑制剂阻挠了正常底物和酶的结合，仅在加大底物浓度时才可逐渐抵消，显然 K_m 值要增加， V_{max} 不变。而非竞争性抑制剂并不直接影响酶与底物的结合，所以 K_m 不变。那么导致 V 下降就由 V_{max} 来完成了。所以 V_{max} 减小。反竞争抑制剂不能靠增加底物浓度来抵消，因为反竞争性抑制剂促进酶与底物的结合。但由于形成三元复合物不能形成正常产物，所以 K_m 变小， V_{max} 也变小。

上述三种可逆抑制作用的动力学分析建立在对米氏公式的各种符号的意义充

分理解和抑制剂作用原理的基础上，辅之于平时完成适量的练习题之后才可逐步掌握。

必须认识到，无论是底物还是抑制剂，和酶的结合说到底是和酶分子的活性基团相结合。结合紧密与否、可逆与否取决于酶和底物及抑制剂双方的结构，例如重金属离子和酶的结合常见于和酶的巯基结合，有机磷农药常和酶分子中的羟基结合，这些抑制剂的结构是可想而知的。此外可逆与不可逆是相对而言的，绝大多数不可逆抑制剂仍可用特殊方法解除。这些特殊方法不包括透析、超滤等物理方法。

不可逆抑制剂的解除方法与临床医学关系密切。有机磷农药的解毒是通过解毒药物和已经结合于酶分子上的有机磷再次结合而使酶游离出来。显然这类解毒药物和有机磷农药结合的强度大于和酶结合。重金属中毒用络合剂或加入其他过量的巯基化合物来解毒。

竞争性抑制原理应用的范例是磺胺药的研制。利用磺胺药和细菌合成叶酸所需的对氨基苯甲酸仅一个碳原子之别（变成了S），使细菌的叶酸不能正常合成，从而导致细菌的核苷酸合成受阻而死亡。而人以摄入叶酸为主，故磺胺药对人的核酸合成无影响。磺胺药的出现是制药工业历史上的一场革命，人类从此真正有能力杀灭细菌。本世纪内，人类曾模拟这一途径，祈求合成一种抵抗或杀灭病毒的药物，如病毒灵的成分即核苷或碱基的类似物。遗憾的是这类药物对病毒和人都有药物作用，至今无法像磺胺药那样可以广泛使用。

4.9.5 pH 和温度对酶促反应速度的影响

联想到本质为蛋白质的酶遇酸、碱和热出现的构象变化，直至出现变性，以及酶作用时依赖的活性中心必需基团解离的状态，不难理解每种酶都有自己的最适 pH 和最适温度。但仍要注意到 pH 对酶活性的影响曲线和温度对酶活性的影响曲线不同，前者的曲线近似对称，而后者不对称。当 T 超过最适温度时，酶活性急剧下降。这是由于蛋白质遇热变性快于遇酸碱变性的缘故。酶在低温和干燥下易保存的道理由此可以理解。

4.9.6 酶活力的表示

酶活力用活力单位（U）表示，这一点类似于抗菌素活力的表示，如青霉素、链霉素常用多少单位来表示，而不直接用重量或浓度。这是因为酶含量低、不易提纯、寿命短、成本高的缘故。国际上统一利用酶作用的结果来描述酶量。除了国际单位外，实际操作中常常使用习惯法来表示。

酶的国际单位规定为：在特定条件下（25℃，最适的 pH、温度和底物浓度等）1 分钟内能转化 1 微摩尔（ μmol ）底物的酶量。

在国际单位之后又出现的一个新的单位为 katal（简称 kat），规定为：1 秒钟内转化 1 摩尔底物所需要的酶量。

因为 1 分钟等于 60 秒，1 摩尔等于 10^6 微摩尔。所以， $1\text{kat} = 60 \times 10^6 \text{U} = 6 \times 10^7 \text{U}$ ； $1\text{U} = 1.667 \times 10^{-8} \text{kat}$ 。

在有了统一的酶活力单位之后，反过来酶活力可用来表示酶制剂的纯度，这就是比活力。比活力是指每毫克酶制品所含的国际单位数或每千克酶制品中所含的 kat 数。显然，取同样质量的同一种酶的制品，含活力单位多的其纯度就越高，如同拿到一支青霉素一样，不能看体积和质量，而是要看注明的单位数。

4.9.7 酶的提取

对于本质为蛋白质的酶来说，其提取过程实际上就是蛋白质的提取过程，不同之处在于：①酶有胞内胞外分布的差异，胞内酶的提取要破细胞；②酶比一般蛋白质容易失去活性，提取过程一般在低温（ $15 \sim -20^\circ\text{C}$ ）下进行，避免过剧烈（过度搅拌，剧烈的酸碱变化等）的操作；③提取过程要保留或添加所需的辅因子。

4.9.8 维生素和辅酶

维持机体正常生命活动不可少的一类小分子有机物叫做维生素。维生素需要量少，分子量小，人体和多种动物不能合成，必须靠食入才可获得。水溶性维生素以辅酶形式参与结合酶的组成为主；脂溶性维生素以独立发挥作用为主。

在物质代谢途径中经常涉及到维生素。维生素以药物制品生产销售，在临床、制药、食品和营养学中经常遇到。基本的学习要点是要能够辨认和区别各种维生素，熟悉各种维生素的符号和辅酶的缩写符号，基本上了解各种维生素作用机理及相应缺乏病。维生素的化学结构虽彼此差别很大，仔细琢磨仍有规律可言。

水溶性维生素的特点：①水溶性维生素溶于水而不溶于脂，不易在体内储存，必须随时摄入；②水溶性维生素主要以辅酶或辅基的形式参与酶的组成；③水溶性维生素辅酶或辅基多为核苷酸的衍生物，是在原有维生素结构式基础上磷酸化、核苷酸化而形成的；④水溶性维生素辅酶或辅基决定酶促反应的性质，主要有脱氢加氢、脱羧羧化、一碳基转运、基团转移、基团变位等。

脂溶性维生素的特点：①脂溶性维生素溶于脂，可在体内储存，故不需每天

都摄入；②脂溶性维生素为异戊二烯类化合物，即碳原子数为5的倍数；③脂溶性维生素以独立发挥生理功能为主。

4.10 食用蛋白

在普通生物化学中，食用蛋白一般不做专门讨论，在食品生物化学中则是不可缺少的内容之一。以人类食用蛋白为例，即是指蛋、肉和奶中的蛋白质。这三类食品因以富含蛋白质而惯称蛋白质类食品。在蛋白质资源开发中又出现了叶蛋白和单细胞蛋白。

4.10.1 肉类蛋白

肉类蛋白主要来自肌肉。骨骼肌中有肌球蛋白和肌动蛋白，皮、骨和结缔组织中有胶原蛋白。胶原蛋白缺少半胱氨酸和色氨酸，蛋氨酸含量也很少。

4.10.2 乳蛋白

酪蛋白是乳蛋白中最丰富的一类蛋白质（80%~82%），含磷酸基，这些磷酸基又和钙结合在一起。酪蛋白由 α_{s1} 、 α_{s2} 、 β 和K四种蛋白质组成，一级结构已经测出，基因分离和重组及人工表达的研究已经相当深入。

乳汁是一种天然胶体溶液，所含的蛋白质、脂肪、无机盐等成分相互作用形成的胶粒结构很稳定，人们一直在对乳汁中酪蛋白胶粒结构进行研究，先后提出了多种模型，但至今仍未真正揭示这一秘密。四种酪蛋白中的K-酪蛋白被公认为天然的蛋白质乳化剂，在稳定酪蛋白胶粒结构中起着关键作用。比较而言，目前以瓦格氏（Wangh）模型最有说服力，此模型认为 α_{s1} 、 α_{s2} 、 β 酪蛋白形成胶粒核心，K-酪蛋白覆盖在这一核心的外侧。作者根据四种酪蛋白的一级结构特点、四种酪蛋白在乳汁中的含量以及电镜下观察到的酪蛋白胶粒形状，提出了一个新的模型——哑铃状结构模型。认为 α_{s1} 和 β 酪蛋白首先形成核心， α_{s2} 处于这一核心外侧并形成球状体，K-酪蛋白贯串在这样两个球之间，故名哑铃结构，钙离子处于 α_{s1} 、 β 和 α_{s2} 三者的磷酸基形成的网络中。在瓦格氏模型提出时，酪蛋白的种类和一级结构尚未肯定和测定，例如 α_{s2} 在瓦格氏模型中没有说明在什么位置和起何种作用。

蛋白质液态食品加工和保存的关键是防止酪蛋白沉淀，加入无营养价值的乳化剂既增加成本又无利于营养，乳汁中酪蛋白的天然状态胶粒结构的研究无疑对开发天然蛋白质乳化剂有很大帮助。近年来人们发现的各种耐热、耐酸碱蛋白

质，特别是热休克蛋白质和植物抗性机理的发现与研究，说明蛋白质的一级结构的组成和排序能够解决蛋白质的耐受性问题。蛋白质工程在这一方面一定有大作为。

4.10.3 种子蛋白

谷物、豆类和油料种子中富含蛋白质。小麦、大麦、大米和玉米的蛋白质含量远远低于大豆。通常根据溶解性对谷物蛋白和油料种子蛋白质进行分类。小麦面粉中的蛋白质形成面筋，由醇溶蛋白和谷蛋白组成，前者溶于 60%~70% 的乙醇，后者溶于稀酸或碱。清蛋白处于面粉的水溶性部分，富含色氨酸，球蛋白溶于稀盐溶液。油料种子蛋白质最主要的成分是球蛋白。

4.10.4 单细胞蛋白

单细胞蛋白来自微生物，如酵母、细菌等。人们将多种工农业废料经微生物转化为蛋白质，既消除了污染，又开辟了新的蛋白质资源。绿球藻单细胞蛋白生产已经得到广泛推广，并商品化。单细胞蛋白生产菌富含核酸，因而其代谢产物——尿酸在体内堆积过多会引起痛风症，目前这一问题已经开始得到解决。

4.10.5 禽蛋蛋白质

蛋白质一词的汉译与禽蛋蛋白质早已被人们所利用有关，在英文中原本是“第一”的意思，这无疑说明了禽蛋富含蛋白质。禽蛋的白色部分以蛋白质为主。禽蛋蛋白质的氨基酸组成和比例与人体所需的氨基酸模式十分接近，而且在所有蛋白质食品中消化吸收利用率最高，是营养学上最理想的蛋白质食品。

4.11 毒蛋白与毒肽

蛋白质不仅有对人和动物有益的一面，同时也有不利或有害的一面。许多生物体中含有有毒的蛋白质和肽，一般是对人而言的。

凝集素、胰蛋白酶和淀粉酶抑制剂是存在于蓖麻、大豆、豌豆、刀豆等籽实中的毒蛋白，其中以凝集素研究得最多。动物中也有凝集素。凝集素对红血球细胞和肿瘤细胞有特异性，在生物学中被广泛用做糖蛋白亲合剂。胰蛋白酶抑制剂的基因已转移到棉花等农作物中，用于防止害虫，这就是基因工程中的抗虫基因工程。

鹅膏毒素是一种环辛肽。鬼笔毒素是一种环庚肽，均来自蕈类。

葡萄球菌肠毒素来自金黄色葡萄菌 (*Staphylococcus aureus*)，是分子量为 $3 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^4$ 的一类有毒蛋白质。肉毒杆菌毒素是肉毒杆菌产生的一类有毒蛋白，毒性大于葡萄球菌肠毒素。

上述有毒的蛋白质和肽几乎都以极微量的摄入可使人致死。从一级结构和空间结构分析，这些蛋白质和肽为什么有毒研究得还很有限，但从蛋白质、核酸和生物膜等的生物化学可以得知，这些毒素无非是和蛋白质的某些残基或修饰部分相结合，实际上就是一种蛋白质-蛋白质的相互作用，同理可以推广到蛋白质-核酸、蛋白质-生物膜等之间的相互作用。所以，深入研究这些毒素的作用机理，紧密联系这些毒素自身的结构，无疑对了解生物大分子之间相互作用具有促进作用。

关于毒蛋白和毒肽的分子生物学，有两个倍受关注的研究对象：一个是凝集素，一个是动物神经毒肽。

凝集素一百年前就已被发现，是一类能和糖类结合的非酶、非抗体的蛋白质，在糖生物化学研究中成为一个重要工具。纯化的植物凝集素已有百余种，测得一级结构的也有几十种，7种植物凝集素的空间结构已被测定。动物凝集素的研究于1968年正式开始，已知的几类动物凝集素与钙离子有关，同糖结合时需要钙离子，大多处于细胞膜上，具有一个共同的糖识别域。最引人注意的是叫做选择素的动物凝集素，与细胞粘着有关，许多动物凝集素的一级结构已测定，选择素是凝集素的另一译名。

神经毒肽见于蛇毒、蝎毒、蜘蛛毒、蟾蜍毒、芋螺毒。动物神经毒肽为单链多肽，一般由10~100个氨基酸残基组成，富含二硫键，二级结构以 β 片层结构为主。神经毒肽的作用部位就是受体，包括乙酰胆碱受体、钠通道、钙通道等。研究神经毒肽在神经生物学、神经药理学和生物膜作用机理方面有重要意义。在祖国医学历史上，许多神经毒素早已被用于药物，用于治疗癫痫、偏瘫、惊风、面神经麻痹，有的已用于肿瘤治疗。

神经毒肽是研究蛋白质结构与功能，膜受体与配体的关系和相互作用的很好对象。神经毒肽分子量小，采集和纯化较容易，生物学作用明显。

4.12 多肽生长因子

化学本质为多肽或蛋白质的调节物质除了一部分激素外还有生长因子。激素通常有专一的内分泌腺，通过血液扩散和有专一的受体。生长因子(growth factor)没有专一的内分泌腺，没有专一的分泌细胞，而是由多种细胞、组织分泌的，扩散的渠道包括细胞间液和血液两种，也没有专一的靶细胞，但在细胞膜上

有跨膜受体，且这样的受体同时具有酶活性，多种生长因子受体共用一种亚基。生长因子的名称取自细胞学，在免疫学上叫做细胞因子（cytokine）、白细胞介素（interleukin）、淋巴因子（lymphokine）、集落刺激因子（colony-stimulating factor）等。这些概念一定要熟悉。

生长因子具有多功能性，包括促进和抑制生长两个方面，彼此之间的作用有协调性。生长因子如同外周和地方信号，激素则为中央或中枢信号。

生长因子大致划分为4类：

(1) 神经生长因子 包括神经营养和突起生长因子两类。如脑源神经营养因子（BDNF）和酸性成纤维细胞生长因子（aFGF）。

(2) 免疫和造血因子 如白细胞介素（IL）、红细胞生成素（EPO）、肿瘤坏死因子（TNF）和干扰素（IFN）等。

(3) 软组织生长因子 如集落刺激因子（CSFs）血小板生长因子（PDGF）转化生长因子 α （TGF α ）等。

(4) 骨组织生长因子 如骨生长因子（SGF）、骨诱导因子（OIF）等。

由于功能交叉，同一生长因子可以同属于上述不同类型。

常见的调节因子的英文缩写符号应当理解并熟记。

生长因子受体化学本质是糖蛋白。一部分生长因子受体具有酪氨酸蛋白激酶（TK）活性，此酶既可以使自身的，也可以使外源蛋白中的酪氨酸残基磷酸化，生长因子受体和癌基因表达蛋白在一级结构上有同源性，所以与癌基因有关。癌变细胞恶性增殖被认为是与生长因子受体病变有关。

报考医学、药学和与生物工程相关类专业研究生的学生要特别注意学好此部分内容。生长因子是现代生物制药的主要对象。

第五章 核酸生物化学

在一般的生物化学教科书中，核酸知识占全书 1/5 左右，似乎比蛋白质的内容少多了，但若包括分子生物学的全部内容，核酸的知识又远远超过了蛋白质知识。核酸研究已经成为生物化学与分子生物学的中心问题，和蛋白质相比，核酸内容更新快，内容也特别复杂和零碎，在生物化学与分子生物学学习中难度最大。

到目前为止，核酸的知识点包括以下内容：

(1) 核酸的构件分子，包括核苷酸的种类、结构式和符号，这些是必须要记忆的。

(2) 核酸一级结构与测定技术。

(3) 核酸的空间结构研究。

(4) 核酸的降解与核苷酸代谢。

(5) 核酸的生物合成。

以上内容为核酸生物化学最基本的内容。

(6) 核酸——一级结构排序规律——遗传语言。

(7) 核酸—核酸的相互作用。

(8) 核酸—蛋白质的相互作用。

(9) 核酸—激素、糖、无机离子等的相互作用。

上述 4 个知识点概论起来，实际上就是基因调控问题，这是目前分子生物学研究的核心问题。

(10) 基因工程，包括蛋白质工程、酶工程等，这是应用分子生物学的问题。

随着人类基因组计划在全球的展开和短期内的完成，核酸研究的基础理论部分将会有根本突破，由此带动生物工程走向更具体、更深入、更广泛的领域，同时也会引发出生命规律认识的一场革命。

5.1 核酸的降解

核酸中 3', 5'-磷酸二酯键经水解断裂而获得核苷酸，核酸中各种核苷酸的组成差异有 3 个方面：一是核糖的区别，DNA 中为 2'-脱氧核糖，RNA 中为核糖；二是 DNA 中常以脱氧胸腺嘧啶核苷酸代替尿苷酸；三是少量核苷酸在生物合成之后或之前有局部修饰而成为稀有核苷酸。稀有核苷酸产生的方式有 3 种：

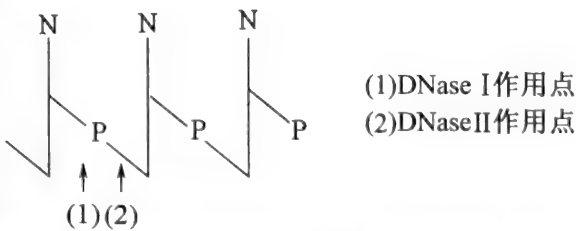
一是碱基环上的修饰，如甲基化、氨基化；二是碱基和核糖之前的糖苷键改变，正常情况下嘌呤核苷酸为 1'-9 相连，嘧啶为 1'-1 相连，否则为稀有核苷酸；三是糖环上的修饰，比较少见。

核苷酸的核糖上的羟基磷酸化以 5' 为主，3',5'-磷酸二酯键的含义是生物合成核酸时，前一个核苷酸的 3'-羟基和后一个核苷酸的 5'-磷酸基缩水相连，由此决定了自然界核酸从左到右书写时左端的核糖 5' 位带有磷酸基，而 3' 位带有羟基。

降解核酸的酶的专一性不同于蛋白酶之处在于，专一性不仅体现在一条链的内切和外切及对 4 种核苷酸的选择，而且要对一条链，特别是二条链同时进行选择，选择的位点可以是一段顺序，限制性内切酶即是如此。

外切酶从一端水解 DNA 单链或 RNA。蛇毒磷酸二酯酶对 DNA、RNA 均可水解，从 3'-OH 端开始逐个水解，产物为 5'-核苷酸，当 3' 端带有磷酸基时不起作用。牛脾磷酸二酯酶和蛇毒磷酸二酯酶相反，从 5'-端逐个水解 DNA 或 RNA，产物为 3'-核苷酸，要求 5' 端有羟基而非磷酸基。

内切酶从核酸链内水解核酸。牛胰核糖核酸酶 (RNase A) 对 RNA 有极高的专一性，作用位点为嘧啶核苷 3'-磷酸与其他核苷酸之间的酯键，产物为 3'-嘧啶核苷酸或以 3'-嘧啶核苷酸结尾的寡核苷酸。核糖核酸酶 T₁ 来自米曲霉，作用位点是 3'-鸟苷酸与其他核苷酸 5'-OH 之间的酯键，产物为 3'-鸟苷酸或以 3'-鸟苷酸结尾的寡核苷酸。核糖核酸酶 T₂ 来自米曲霉，作用位点为 3'-腺苷酸与其他核苷酸之间的酯键，可将 RNA 完全降解为 3'-腺苷酸和寡核苷酸。牛胰脱氧核糖核酸酶 (DNase I)，水解双链或单链 DNA 成为以 5'-磷酸为末端的寡核苷酸，优先选择嘧啶核苷酸位点。牛脾脱氧核糖核酸酶 (DNase II) 降解 DNA 成为以 3'-磷酸为末端的寡核苷酸。上述两种 DNA 酶不同处在于对磷酸二酯键左右两则选择性。



Bal31 主要作用于 DNA 双链双末端，平头和带延伸末端均可。 λ 噬菌体核酸外切酶，从 DNA 双链上依次切下 5'-单核苷酸，对单链 DNA 也有作用。 λ 末端酶切割含有 COS 区 (GGGCGGCGACCT) 的双链 DNA，产生 12 个碱基互补的 5' 突出末端。RNA 酶 H 水解 RNA-DNA 杂交分子中的 RNA 链，产生 5'-单核苷酸。绿豆核酸酶降解单链 DNA 或 RNA，产生带 5'-磷酸末端的单核苷酸或寡核

苷酸。

限制性内切酶的命名由 3 个字母组成，第一个字母大写，来自微生物属名第一个字母；第二、第三个字母小写，来自微生物的种名头两个字母。可再加一个大写字母表示变种或品系。目前已知有限制性内切酶 I、II、III 型，I 和 III 型在 DNA 重组中使用不多。II 型限制/修饰系统由一对酶组成，即由一种切割核苷酸特定序列的限制酶和一种修饰同样序列的甲基化酶组成。大多数 II 型的酶的识别序列为 4~6 个双重对称的核苷酸，可产生平头或单链突出（5'-或 3'-）的黏性末端。许多不同的限制酶能识别相同的序列，称为同裂酶。有些不同的限制酶可产生互补的末端，即一种酶所产生的末端可同另外一种酶产生的末端互补，在 DNA 重组中非常有用。

碱性磷酸化酶，可特异性切去 DNA 或 RNA 的 5'-磷酸基，对双、单链 DNA 和 RNA 均可作用，也可以是核糖或脱氧核糖核苷三磷酸。

末端脱氧核苷酸转移酶，来自小牛胸腺，可将一个单核苷酸转移到另一个 DNA 分子的 3'-OH 末端上。

5.2 核酸的测序

由于二类核酸主要各由 4 种核苷酸聚合而成，DNA 一般为双链且互补。核酸中核苷酸的组成比起蛋白质要简单多了，一般无需知道核苷酸的组成而直接进行测序。

在生物化学与分子生物学研究的各个领域，核酸测序问题一直是诸多问题的焦点。20 世纪 70 年代开始核酸测序技术有了突破，为生物化学与分子生物学提供了坚实可靠的大量的核酸和蛋白质结构信息，使得原核生物的生物工程取得很大进展。但面对像人染色体内含 3×10^9 bp 的这样巨大的基因组，已有的测序技术显得力不从心。历经千万科学家 20 余年的连续工作，原估计到 2004 年完成的人类基因组计划已在 2000 年 6 月提前基本完成。得知人的基因组是由 3×10^9 碱基组成的，总基因数约为 2~3 万个，负责编码蛋白质的基因仅占到全部基因的 2%。在此之后不久，水稻、酵母等基因组测序也已完成。

对付像人类 DNA 这样的大分子，目前测序工作的步骤是：建立遗传图谱—获得物理图谱—DNA 测序。这一步骤的核心是化大为小、化整为零、分段测序、最后获得整体顺序。前二步实际上是在 DNA 分子上寻找个建立化大为小的标志，为化大为小、分段测序奠定基础，第一步实际上是用经典和分子遗传学方法进行初步的基因定位，第二步是用限制性内切酶将完整的 DNA 分子在专一性位点将 DNA 分子切割为具有黏性的或部分顺序已知的片段，终极的基因定位是 DNA 序列测定。

建立遗传图谱 基因在染色体上的排列叫做遗传图，目前建立遗传图谱的方法主要有 3 种：一种是遗传交换定位；一种是接合定位法；另一种是染色体步行法和染色体跳跃法。

遗传交换定位法 同源染色体的减数分裂期发生交换。位于同一染色体的不同基因在单倍体分离时倾向于在一起，仅发生交换时才分开，而处于不同染色体上的不同基因在单倍体分离时随机分配，相隔较远的基因因交换引起遗传重组机率较大，两个基因之间的重组率等于遗传图上两个基因的图距单位。

接合定位法 细菌的致育因子 F 整合到细菌染色体上，共同组成雄性细胞染色体，整合后的 F 因子受 F 因子自身编码时特异酶切割而 F 因子一条链断裂，并首先进入雌性细胞，受人工控制，雌、雄细胞结合时间可分段完成，由此可知雄性细胞基因随 F 因子进入雌性细胞的先后顺序，显然，某个基因需要结合时间愈长，说明雄性细胞的这个基因距离端点愈远，由此可对雄性细胞中染色体的基因定位。

5.2.1 染色体步行和染色体跳跃

用限制性内切酶将完整 DNA 分子切开成片段，然后分别用载体重组并导入寄主细胞进行细胞克隆，实际上就是重组导入寄主细胞的染色体片段的克隆，称为基因克隆。如果全套基因组分别历经这样的克隆，就可获得基因组克隆，其中克隆的一套基因组叫做基因组文库，之后用各种已知顺序的 DNA 探针针对基因组文库进行挑选。

如果恰遇某个基因被限制性内切酶切割分开，选某一个基因的两部分分别以两个片段克隆。此时可将其中一个克隆中的这个基因片段再进行一次克隆，称为亚克隆，然后分离亚克隆中的这个基因的片段并放射性标记，依此为探针去寻找该基因的另外部分。由此等于是从一个染色体片段步行到另一个片段，相当于在一条染色体步行，故名步行法。由于现在克隆 DNA 片段的大小是有限的，且很小，所以步行法能走动的距离在 1000kb 左右。

如果将染色体 DNA 用识别序列长的限制性内切酶切割成较大的片段（百万 bp），这样克隆后获得基因组文库为染色体跳跃文库。建立跳跃文库历经二次限制性内切酶切割，一次片段大，一次片段小。两次和质粒重组，第一次重组后成环，再经第二种切点多的限制性内切酶切割，获得片段中间夹着质粒，两端仅连有小片段的基因组 DNA，这样的带有质粒的基因组 DNA 再次重组进入 DNA 中，并在大肠杆菌进行克隆，由此获得的基因组文库即跳跃基因组文库。因为此时的第一次重组而且位于中间的质粒两侧的基因组原本在染色体中实际上不仅不相邻，而且至少有小于百万 bp 距离的间隔。这样定位基因时在同一染色体内走的

步子已不是一步一步连着走，而是跳跃式的前进了。

从上述遗传图的制作方法可知，对于 DNA 分子较小的原核生物和真核生物的基因组，遗传图的建立已经距离完整的 DNA 测序不远了。而对于像人类 DNA 分子说来，由于 DNA 分子大，富含重复序列，且有多条，遗传图的建立仅仅是 DNA 测序工作的一小步。但这一小步的作用不可低估，它毕竟是将完整的 DNA 拆分成了易于进一步测序的碎片，为下一步测定提供了大量的有用标志。目前生物工程使用的各种 DNA 序列知识大部分出于这一工作的成绩。特别是真核生物中不断发现的各种抗性基因、致病基因和顺式元件，为了解 DNA 分子序列的结构特点，使应用分子生物学技术走在理论研究前列奠定了基础。

5.2.2 物理图谱

物理图谱是各种限制性内切酶识别位点在 DNA 序列上的线性排列，物理图谱的作用在于：①反映 DNA 一级结构的整体特征；②为分子克隆和测序提供将完整 DNA 切割成小片段的位点；③为 DNA 分子克隆后筛选目的 DNA 序列提供帮助。物理图谱的基本要求为：①酶切位点一般不超过 20 个；②切割后获得的 DNA 片段不可相差太大，这主要是考虑到分离时的精确性。小片段（<1kb）用聚丙烯酰胺凝胶电泳，大片段（0.02~50kb）用琼脂糖凝胶电泳，更大的片段（>50kb）要用脉冲电泳。即使同一种凝胶，如果片断大小差别太大就需要不同浓度的凝胶，大片段用低浓度凝胶，小片段用高浓度凝胶分离。

物理图谱表示方法 ①凝胶上的 DNA 片段以英文大写字母表示，片段从大到小分别为 A、B、C 等。当超过 26 个时，改用小写字母；②迁移率相同的片段分别用不同的字母表示；③通常以某种限制酶位点为零点，将 DNA 分为 100 等份，每等份为一个图距单位；④标示方向为从左到右或顺时针方向。

物理图谱构建方法 现有双酶法、部分酶切法、Bal31 酶切法和双向电泳末端标记法等。

双酶法 采用两种限制酶，先用一种分别切割，然后根据具体情况进行整体同时切割或某些第一次切割后的片段组合后再同时切割。双酶法可以得到两种甚至多种限制酶的物理图。

部分酶切法 仅用一种限制酶，通过限制使用酶浓度和反应时间可以使 DNA 部分酶切，但操作时要先全酶切再部分酶切。这一方法用途较广，例如可以测 DNA 片段的分子量。当 DNA 放射性标记后，可从获得的片段的放射性占整个 DNA 分子放射性的百分比推算出分子量。

Bal31 酶切法 Bal31 可以从线性 DNA 两端逐步向内切割，当反应条件受到控制时（如控制反应时间），向内切可获得大小不等的片段，之后再另一种

限制酶切割这些片段。

双向电泳末端标记法 将线性 DNA 两端标记，经第一种限制酶切割后走电泳，再在该凝胶上直接用第二种限制酶切割，之后将该凝胶转 90°后再次电泳。

从以上方法可以看出，构建 DNA 限制酶图谱的关键是如何控制限制酶的作用，无论怎样使用限制酶，只要能在待测 DNA 分子中建立距离位点数适合的切割点图谱即可。

5.2.3 DNA 测序技术

迄今为止，DNA 测序技术历经 20 余年的积累已经多样化。应用最多和最具有代表性的方法为 Sanger 的酶法和 Gibert 的化学法。从原理上讲，Sanger 的方法是开创性的。

值得一提的是，Sanger 是世界上第一次建立蛋白质测序方法的人，也是第一个解决 DNA 测序问题的科学家，他一生因此获得二次（1958、1980）诺贝尔化学奖。

核酸测序的基本原理不同于蛋白质的序列测定。蛋白质的序列测定是直接测定待测蛋白质的氨基酸残基，一般是从 N 端逐个进行。而核酸的序列测定是靠待测核酸的长度来进行。从待测核酸链获得不同长度的片段，彼此相差可达到相差一个残基的水平，经电泳分离排列出片段的大小顺序。长度相同，3'-OH 末端残基相同（位置和种类都相同）的片段处于同一条电泳带中。根据专一性水解方法不同，目前主要有酶法和化学法两类方法。

酶法测序最早是 Sanger 发明的“加减法”，后又发展为末端终止法。

“加减法”的关键在于利用了复制酶同时具有聚合和外切两种酶活性。当 4 种核苷酸提供充足时，该酶以待测 DNA 链为模板，进行正常复制；当 4 种核苷酸缺少其中一种时（“减法”原理），复制酶显示出外切活性，如缺 A 时，当遇到模板上出现 T 时，复制酶从正在复制的片段后水解除去 A，由此留下在这一位点之前的部分；当 4 种核苷酸只有 1 种而无其余 3 种时（“加法”原理），正在复制的 DNA 均以这 1 种核苷酸结尾。这样，人们可以设计两套各 4 组的反应体系，“加法”的 A、G、C 和 T 及“减法”的 A、G、C 和 T。“加法”的 A 体系以 A 结尾，“减法”的 A 体系以 A 之前的核苷酸结尾，二者相互对照，即可决定各个位点为何种残基。

在“加减法”之后，Sanger 又提出末端终止法，采用 ddNTP 专一性终止复制。ddNTP 3' 位无 -OH，此种核苷酸一旦进入正在复制的 DNA 片段中，复制终止。由于同时加入有 4 种正常核苷酸，控制好每种 ddNTP 和正常核苷酸的比

例,即可实现随机专一性终止复制。同样可分为4组:ddATP、ddGTP、ddCTP、ddTTP。

酶法测序的条件是:单链DNA、引物、DNA聚合酶。目前解决单链DNA的方法是用M13mp和其他具有M13mp复制起点的质粒进行克隆。DNA聚合酶除了聚合酶I之外,Klenow片段、反转录酶、TaqDNA聚合酶和修饰的T₇DNA聚合酶(测序酶)都可使用。

化学测序法的关键是采用了一些化学试剂对4种核苷酸残基之间3',5'-磷酸二酯键进行切割。G反应用硫酸二甲酯。G+A反应用甲酸。T+G反应用胍和哌啶。C反应用NaCl+胍+哌啶。G+A反应结果除去G反应即得A反应。T+C反应结果除去C反应即得到T反应,目前尚无用于A和T专一的化学试剂。

化学和酶测序方法共同的步骤是放射性标记聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影。

放射性标记一般在待测DNA的5'端,标记时常采用 $\alpha^{32}\text{P}$ 、 ^{35}S 和 ^{33}P ,近几年又采用非放射性标记,如dioxetane(商品名Lumigen PPD)。标记位点在何处很重要,特别是在完成习题过程中。如果要直接写出两种方法可获得的各种测序过程中出现的片段,而且要从大到小排队,甚至在纸上标出各种片段在凝胶板出现的位置,须知标记位点实际上等于告诉了测序过程的方向,如果标记位点在5'端,等于说,测序是3'到5'端。因为标记的5'端要保留到最后。

酶法和化学法的最大不同点在于,酶法是通过不同程度的复制间接测知模板顺序,而化学法是直接在待测DNA分子上进行测序。

遗传图、物理图帮助人们对DNA进行直接测序,测知的序列反过来仍然要服务于遗传图和物理图。对于一个碱基序列已知的DNA分子,当需进行基因重组时,人们可以从容地根据遗传图找到目的基因的区间,进而结合物理图,选择合适的切割重组位点,防止将目的基因从内部切开和在目的基因中夹杂不必要的组分。对于一个基因而有多个拷贝,甚至这些拷贝不集中排列时,人们可以有挑选的可能,从而减少了各种基因操作的盲目性。

必须认识到,由于至今对真核生物DNA的完整序列了解甚少,目前的各种真核生物基因操作必然带有很大的随机性、偶然性和盲目性,所以,许多基因操作的重复性很差,否则,人类便不会花费巨资测定人的DNA顺序了。

5.2.4 核酸一级结构与遗传信息

以DNA为遗传物质的生物遗传信息来自DNA,以RNA为遗传物质的生物遗传信息位于RNA之中。许多病毒和细菌的全部遗传物质的核苷酸顺序已经全部测出。人们对原核生物遗传信息的认识比对真核生物的认识要全面和深刻得

多。真核生物遗传信息的认识目前尚不完善, 已知的内容还很零散, 随着人类基因组计划的实施, 真核生物的研究必将出现飞跃。

生物遗传信息的分布除了原核生物和真核生物基因组外, 还有质粒、线粒体和叶绿体中 DNA 分子携带的信息, 这一点不可忘记。一般教科书中很少包括这部分内容, 导致人们往往误认为遗传信息只是分布在染色体上。

5.3 基因组特点

5.3.1 原核生物基因组特点

原核生物基因组特点: ①基因组小。E. coli 为 4.2×10^6 bp, 3000~4000 个基因。ΦX174 噬菌体为 5386 个核苷酸, 11 个基因。λ 噬菌体为 48502bp, 46 个基因。②几乎无蛋白质同核酸结合。③呈现操纵子结构。④有单拷贝和多拷贝两种形式。⑤有重叠基因。⑥多顺反子。

5.3.2 真核生物基因组特点

真核生物基因组特点: ①基因组很大。人为 3×10^9 bp。酵母为 1.3×10^7 bp。②和蛋白质结合, 形成染色体, 且有多条。③有重复序列。④以单拷贝和多拷贝两种形式存在。⑤基因不连续。⑥基因家族化。⑦DNA 片段可以重排。⑧单顺反子。

5.4 质粒 DNA 特点

质粒 DNA 特点: ①双链环状。②分子量很小。③自主或半自主复制。④不同生物质粒中的基因种类不同。细菌质粒为: F 因子、R 因子、大肠杆菌素因子。酵母质粒为 2μ 质粒、 3μ 质粒。

线粒体 DNA 特点: 有非通用遗传密码。已知线粒体 DNA 基因有: tRNA 基因、rRNA 基因、cyt 氧化酶基因、cyt 还原酶基因、ATP 合成酶基因、抗性基因等。

叶绿体 DNA 已知基因有: tRNA 基因、rRNA 基因、二磷酸核酮糖羧化-加氧酶大亚基基因、内囊体膜蛋白基因、ATP 合成酶基因等。

5.5 以 RNA 为遗传信息载体的基因结构特点

目前已知以 RNA 为遗传信息载体的生物仅限于病毒,如噬菌体 θ 、 β ,灰质炎病毒,狂犬病病毒,呼肠孤病毒,白血病毒和肉瘤病毒等。这些病毒又分为双链 RNA 和单链 RNA 两类,前面列举的病毒除呼肠孤病毒外,均为单链 RNA。单链 RNA 病毒内含的 RNA 有正、负链和反转录式 3 种,正链 RNA 即等于 mRNA,负链 RNA 要经复制后得到正链 RNA,反转录的单链 RNA 经反转录成 DNA 后再繁殖,因此,这 3 类病毒的 RNA 分子中含有各自所需的部分蛋白质和酶的基因。双链 RNA 病毒具有 RNA 双链不对称转录的酶的基因。常见的 RNA 病毒和 DNA 病毒基因组特点如下:

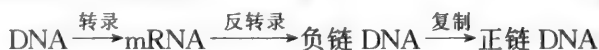
烟草花叶病毒 (TMV) 由一条正链 RNA (mRNA) 组成,6395 个碱基,5'端有 m^7GpppG 帽子,编码外壳蛋白、复制酶、细胞间运动蛋白等。

水稻矮缩病毒 (RDV) 由 12 条双链 RNA 组成,依次命名为 S_1 到 S_{12} 。除 S_{12} 外,每个组分只编码一个多肽,如 S_1 编码 1444 个氨基酸残基组成的蛋白质, S_2 编码 1116 个氨基酸残基, S_3 编码 1019 个残基, S_{12} 编码 4 种蛋白质。RDV 编码的有些蛋白质有锌指结构。

花椰菜花叶病毒 (CaMV) 由环状双链 DNA 组成,约有 8kb。 α 链是负链,作为转录模板。 α 链有一个缺口。CaMV DNA 的转录产物有帽子和 poly A 尾,体外翻译可得到 8 种蛋白,体内翻译可得到 5 种蛋白,其中有反转录酶、DNA 结合蛋白、外壳蛋白、运动蛋白、协助组装蛋白等。

艾滋病病毒 (HIV) 由两条单链正链 RNA 组成,每个 RNA 约有 9.7kb,有帽子和 poly A 尾结构,编码有结构蛋白、蛋白酶、外膜蛋白和其他酶。有复杂的调节基因。HIV 编码的反转录酶以 RNA 为模板合成单链 DNA。

乙型肝炎病毒 (HBV) 由有部分单链区的环状双链 DNA 分子组成,两条链长度不一。长链为负链,短链为正链,正链长度有不确定性,导致 HIV 的基因组有多重性,这是 HBV 高度变异性的分子基础,其基因组功能单位密集压缩后重复利用率非常高,4 种转录产物均有 poly A 尾,分别编码核心蛋白、S 蛋白、X 蛋白。HBV 内含增强子,X 蛋白是这一增强子的反式调控因子。S 蛋白包括乙肝表面抗原蛋白、其他蛋白质、核心抗原和多种酶蛋白。HBV 的 DNA 不通过半保留复制而复制,而是采用了反转录,



SV40 由 5324 碱基组成,其 DNA 分为早晚期区,有增强子和早晚期调控区。早期转录产物为 TmRNA 和 tmRNA。t 蛋白为 DNA 结合蛋白,T 蛋白参

与肽链磷酸化。晚期转录产物有 19S、16S 两种 mRNA，前者翻译产物为外壳蛋白，后者翻译产物为 VP₁。VP₁ 的 61 肽前导序列参与外壳蛋白的表达调控。

通过对原核和真核生物基因组结构特点的了解可以从中看出：①DNA 的序列可以分段重复；②DNA 的序列可以编码蛋白质，也可以仅编码 RNA，也可以不编码任何物质；③DNA 的序列有可变性，分为自变、他变、原位改变和跳跃式插入移位，乃至到另一条染色体上；④DNA 编码的序列可连续也可不连续；⑤DNA 分子中序列编码能力可以重复使用；⑥DNA 序列的各种活性是可控的，起码有自调控和外调控；⑦不同染色体（同细胞甚至不同细胞）上的 DNA 片段可以转移；⑧不仅是 DNA，RNA 也可直接编码蛋白质。

5.6 重要概念

生物化学与分子生物学的深入研究，相继积累了相当多的令人眼花缭乱的概念，理解和记忆这些概念比较费时，且效果往往不佳，一个普遍的原因是学习中没有掌握好的方法，分子生物学的概念处理要注意以下关键：

(1) 概念所指的对象。分子生物学中的容易相混的概念往往集中在 DNA、mRNA、rRNA 和蛋白质上，遇到一个概念，务必首先搞清这个概念是针对哪种物质而言的。有一位教师曾以化石这个概念为例说明这类问题，若问什么叫化石，学生首先要知道，化石首先是石头，是一种特殊的石头，然后回答化石是生物和动物的尸体经长期矿化而保留了该动物原有的部分个体结构的特殊石头。同理，要回答什么叫遗传信息，首先要回答遗传信息主要指 DNA 分子中核苷酸分子序列所携带的信息，至于有些生物以 RNA 为遗传物质和遗传信息有两类，一类是蛋白质结构信息，一类是基因之间相互作用、与基因表达活性调控有关的信息等则是需要进一步详细说明的内容。

(2) 许多分子生物学概念来自重大的实验发现，真正搞清这些概念，一定要对该实验有详细了解，这有助于记忆，否则靠死记硬背的方式，学习的负担加重了，而且学习得很浮浅，领会得不深刻。自如地用自己的语言回答问题非常重要。

关于基因组结构特点的研究集中了一大批分子生物学的重要概念，每一个这一领域的概念都来自一个重要的实验发现，对应于每一个这样的概念，了解一个例子非常必要。

5.6.1 基因组、染色体外遗传因子

细胞核内 DNA 的总称或染色体全部基因的总和叫基因组。核外的质粒叶绿

体、线粒体等细胞器的 DNA 携带的基因，通常叫做染色体外遗传因子。必须知道，以 RNA 为遗传物质的病毒的基因组是指 RNA 的总称，这类基因组需要寄主基因组的配合。

5.6.2 转录单元、多顺反子、操纵子、调节单元

这些概念彼此相关，转录单元、操纵子和调节单元是针对 DNA 而言的，而多顺反子针对的是 mRNA。多顺反子是转录单元、操纵子和调节单元转录的产物。1960~1961 年 Jacob 和 Monod 提出，大肠杆菌乳糖发酵过程中相关酶的结构基因 LacI、操纵基因 LacO、调节基因 LacZ 和启动子 P 共同组成一个乳糖操纵子。乳糖操纵子解释了葡萄糖效应，成为原核生物基因表达调控的主要模式。操纵子中的功能相关的结构基因因一起被转录而叫做转录单元，受一种调节蛋白控制的几个操纵子构成的调节系统叫做调节单元或调节子。

5.6.3 重叠基因、重复序列、卫星 DNA

这三个概念容易混淆。序列重复不一定是基因重复。重叠基因是 F. Sanger 于 1977 年正式提出的，因发现 Φ X174 这种单链 DNA 病毒的 5375 个核苷酸却编码了相当于 6078 个核苷酸编码的多肽，由此得知该病毒的 9 个基因是重叠的。重叠的方式有 3 种：①一个基因全部处于另一个基因中；②部分重叠；③只有一个碱基的重复。

重复序列见于真核生物染色体。重复序列中每一个被重复的序列叫做一个拷贝，是被重复的对象。被重复的是序列，即一段 DNA 顺序，不是某个核苷酸的重复。被重复的序列重复 2~10 次叫做轻度重复， $10\sim 10^4$ 次重复叫中度重复，几百万次的重复叫做高度重复。高度重复序列往往在 DNA 两链上形成嘌呤类和嘧啶类碱基含量的不对称分布，导致一条链轻而另一条链重。在 CsCl 密度梯度离心中容易和含量多的主峰分开而另形成总是伴随着主峰出现的小峰，故名卫星 DNA。

5.6.4 不连续基因、内含子、外显子、介入顺序

1997 年 Broken 和 Sharp 等人发现了不连续基因。大多数真核生物的基因是不连续基因。在 DNA 分子中基因编码序列常被不编码的序列隔开，这种不编码的序列叫做内含子，又称内元或介入序列，编码的序列叫做外显子或曰外元。已经证实，内含子和外显子的划分不是绝对的，首先是不限于真核生物，有些原核

生物也存在；另外内含子也可编码，外显子也可不编码。所以不连续基因的研究有待深入，在一个基因中的内含子又可能是另外基因的外显子。不连续基因中的内含子在转录时照样被转录，只是在 mRNA 合成的加工中被切除。介入顺序不等于插入顺序。

5.6.5 假基因、转位因子、插入顺序

1978 年 J. Miller 从非洲爪蟾 5S rRNA 基因的研究中发现，有一些 DNA 序列与有功能的基因相似但又不完全相同，主要缺少一部分顺序，不能被转录，当然也不能表达合成多肽，因此叫假基因。后经研究，这类 DNA 顺序主要是缺少启动子或终止密码子提前和推迟出现，或缺少其他调控区而导致不能被转录和翻译，有可能是正常基因突变所致。

导致正常基因活性改变的另一发现是转位因子，转位因子在同一个细胞的不同染色体、不同细胞间或者同一染色体的不同位点之间转移，但在原位点上这种序列并不丢失，仅是它的一个新拷贝的转移。

1951 年，McClintock 发现转位因子，转位因子又称转座元、转座子。转位现象在原核和真核细胞中都存在，也有将转位因子叫做可移动的基因。

根据转位的 DNA 序列是否携带有基因及携带何种成分等，又将转位的 DNA 序列划分为：①插入序列或 IC 因子，这类转位的 DNA 序列不含任何基因，仅仅是一段 DNA 序列结构，插入新位点使该点处原基因失活，插入序列是细菌染色体、质粒和某些噬菌体的正常组分。插入序列不携带其他基因，但内含与自身转变有关的基因。②复合转位因子，由左右两个重复序列（臂）夹着一个或多个结构基因组成，左右两端的臂可以是插入序列，这两个臂与复合转位因子插入新位点的能力相关。中间夹着的结构基因往往是抗药性基因，抗重金属基因等。复合转位因子的命名以 Tn 开头，后面的数字表示不同的转位因子，如 Tn10 表示为携带抗四环素基 tet^r 的转位因子。③TnA 型转位因子，两端无 IC 臂，总长 5kb 内夹着结构基因，如 Tn3，全长 4957bp，两侧为两个反向重复序列（38bp），内夹 3 个结构基因，最左侧为转位酶基因，最右为 β -内酰胺酶基因，该酶使氨苄青霉素失活，中央的基因编码 TnPR 蛋白。④ M_μ 噬菌体，能够温和地插入到细菌染色体 DNA 中产生各种突变。⑤酵母中的 Ty 因子。⑥果蝇中的 copia 基因。⑦玉米中的控制因子。

5.6.6 基因家族、重复顺序

真核生物部分基因多拷贝且串联在一起，中间夹杂着一些重复序列，这些基

因来源相同, 结构相似和功能相关, 已经发现的基因家族有:

珠蛋白基因家族 由位于第 16 染色体上的 1 个活性 ξ 基因、1 个假多基因、2 个 α 基因和 2 个假基因, 位于第 11 染色体的 ϵ , 2 个 γ , δ 和 β 基因组成。随着个体发育进行, 逐步过渡到以 $\alpha_2\beta_2$ 为主的血红蛋白形式, 说明这些基因的表达有严格的时序。

免疫球蛋白基因族 一个动物个体的百万种以上的抗体在结构上大同小异, 这是由 V、C、J、D 等基因之相互连接和转录后加工而形成的。免疫球蛋白基因的表达有严格的时序。

热休克基因 由于热诱导而合成的蛋白质称为热休克蛋白 (HsP)。热休克蛋白基因表达不仅由高温诱导, 酒精、水杨酸钠等条件也可诱导。每一种热休克蛋白的基因有多个。

组蛋白基因族 呈现中度重复顺序, 且无内含子。

tRNA 基因 5S、5.8S、18S、28S rRNA 均为中度重复序列, 在细菌和低等真核生物中, 23S、16S 和 5S rRNA 的基因重复单元中, 插入有 tRNA 基因, 高等真核生物的 rRNA 和 tRNA 基因转录各自独立。

5.7 核酸二级结构

目前核酸二级结构重点在于 DNA。DNA 的二级结构公认为双螺旋结构, 由 Walson 和 Crick 1953 年提出, 理论依据为查格夫规律, 实验依据为 DNA 纤维晶体的 X 射线衍射分析。

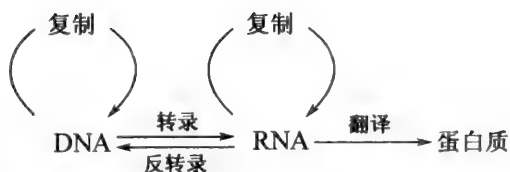
这一理论的要点是: ①两链平行反向且右旋; ②两链之间碱基以氢键配对互补, $A=T$, $G\equiv C$; ③螺旋每周含 10 个碱基对, 每周垂直升高 34\AA , 螺旋直径 20\AA ; ④磷酸-核糖主链在螺旋外侧, 碱基对平面在内侧且和主链垂直。

这一理论的核心是碱基配对互补。

此理论模型的意义在于, 通过碱基配对互补, 可以解释: ①细胞减数分裂和有性生殖——配子与受精卵的形成, 即 DNA 双链分开和来自双方配子的单链 DNA 分子重新组合成双链; ②个体发育, 一个受精卵的 DNA 双链通过互补复制而重复合成; ③遗传与变异, DNA 分子碱基序列具有保守性、可变性, 碱基是突变的最小单位; ④性状控制, 蛋白质生物合成时密码与反密码的配对识别。

这一理论历经近半个世纪的检验, 在基本内容不变基础上, 出现了如下补充: ①DNA 分子双链可左旋, 发现 Z-DNA; ②DNA 分子每圈碱基数的可变性, 发现 A-DNA; ③发现三股 DNA; ④超螺旋结构的普遍存在。

根据 DNA 双螺旋结构学说的研究, 形成和发展了生物中心法则:



DNA 双螺旋结构学说是分子生物学的基石。

5.8 DNA 的构象异构

如果 DNA 分子或 RNA 分子的一级结构相同,但空间结构不同,这实际上就是构象异构体。由于一般而言,一级结构决定高级结构(这一理论来自对蛋白质结构的研究),人们容易认为,核酸的空间结构一旦形成便很难改变,实际情况并非如此,核酸的空间结构是经常变化的。在线形 DNA 的双螺旋结构被确认之后,人们又对环状 DNA 进行了研究,发现了超螺旋结构——双螺旋之后的再螺旋。随之对线形 DNA 的进一步研究,特别对染色体中核小体的研究,认识到超螺旋结构普遍存在于核酸之中。

环状 DNA 第一次螺旋之后的再螺旋,首先是一个再螺旋的方向问题,如果第一次右旋,第二次很容易左旋,这如同拧双股的绳子。但如果第二次仍然右旋,其结果又会怎样,由此人们提出了表示超螺旋的 3 个参数, α 、 β 、 τ ,也有用 L 、 T 和 W 表示, α 或 L 为两条链的互绕数, β 或 T 为两条链第一次螺旋化的圈数, τ 或 W 为第二次螺旋化,即超螺旋化的圈数,三者之间的关系为: $L(\alpha) = T(\beta) + W(\tau)$ 。

如果螺旋和超螺旋的方向相反,即 $T(\beta)$ 和 $W(\tau)$ 的方向相反, $L(\alpha)$ 的值必然减少;如果螺旋和超螺旋的方向相同, $L(\alpha)$ 值必然增加。自然状态下,第一次螺旋和第二次螺旋的方向相反,所以 $L(\alpha)$ 值总是小于 $T(\beta) + W(\tau)$ 。

如果把第一次螺旋方向向右称为正向螺旋,那么,生物体内 DNA 分子的超螺旋当然是负向超螺旋。负向超螺旋使 $L(\alpha)$ 值减少了。使螺旋更紧密时,可以增加负超螺旋,但要继续增加负超螺旋,以至第二次螺旋数超过了第一次螺旋数,这等于解开第一次螺旋。

$L(\alpha)$ 值不相同,但一级结构相同的两个 DNA 分子,称为拓扑异构体,催化这种转化的酶为拓扑异构酶。拓扑异构酶可改变 $L(\alpha)$ 值,使 $L(\alpha)$ 增加者为拓扑异构酶 I,也叫 ω 蛋白;反之为拓扑异构酶 II,也叫促旋酶。

5.9 核酸一级结构与种属差异

世间物种千差万别,但最根本的差别在于遗传物质。迄今为止公认的遗传物

质是核酸，除少数病毒外，均以 DNA 为遗传物质。DNA 一级结构的不同是物种差异的根本原因。目前已知的 DNA 一级结构的差异在于：①DNA 链的长度差异与 C 值矛盾；②DNA 链的数目（染色体数目）；③DNA 分子中碱基排序的差异；④嘌呤碱基和嘧啶碱基分布的不均一性（富 GC 区、富 AT 区）；⑤相邻二核苷酸嘌呤和嘧啶类排序的差异；⑥反向重复序排（回文序列）；⑦Cot 值与基因组大小；⑧编码蛋白质的序列与编码 tRNA、rRNA 的序列和非编码序列的不同；⑨DNA 分子裸露与否；⑩DNA 分子序列内未知力或作用的存在。这十个方面，归根结底是 DNA 分子中序列的差异和这些差异至今未知的作用力。

由于真核生物核酸一级结构信息研究尚未有根本突破，上述各种尝试显得很浮浅和零碎，随着结构生物学和信息生物学研究的深入，无疑可以预知，今后的核酸研究将转向与数学和物理学相互交叉，而以化学原理和方法为主研究核酸的时代很快要过去。

5.9.1 DNA 链的长度、数目与 C 值矛盾

生物的结构和功能越复杂，所需的基因种类越多。通常把一个物种的单倍体的染色体所含的 DNA 称为 C 值。然而，有些物种的 DNA 含量与其结构和功能并不相一致，如两栖类的某些动物的 C 值显然大于人类，即使同为两栖类彼此相差也很大。哺乳动物实有的 DNA 含量按已知基因大小估计可能有的基因种类远远大于实际所需的 DNA 含量，这就叫做 C 值矛盾。这一事实存在的原因仍有待进一步研究。

5.9.2 嘧啶和嘌呤类核苷酸分布的不均一性

由于嘌呤类碱基的环大于嘧啶类，在 DNA 两链间存在的碱基配对总是一大一小（ $G \equiv C$ 、 $A = T$ ），但对于其中一条链说来，如果某些区域富含 AG 或 CT，这就意味着不均一。G 和 C 之间比 A 和 T 之间多一个氢键，同一条链上 A 和 T 越多，意味着此处双链容易解开。目前发现的多种不均一区域，如卫星 DNA、复制起点和启动子等，都与这一现象有关。

5.9.3 相邻核苷酸顺序的差异

用 T_m 值判定四种碱基相邻的关系发现，相邻二核苷酸的 T_m 值相差显著。

如 $\begin{matrix} \leftarrow \\ \text{TA} \\ \rightarrow \end{matrix}$ 的 T_m 值最低, $\begin{matrix} \leftarrow \\ \text{GC} \\ \rightarrow \end{matrix}$ 不同于 $\begin{matrix} \leftarrow \\ \text{CG} \\ \rightarrow \end{matrix}$ 。在 64 个密码子中, UAA 是最有效的终止

码, 可能是因为 $\begin{matrix} \leftarrow \\ \text{UAA} \\ \rightarrow \end{matrix}$ 的 T_m 值最小。

用 ΔG° 和碱基堆积力研究这一现象得出的结果和用 T_m 值研究的结果相结合, 初步证明嘌呤环和嘧啶环的重叠面积大于嘧啶环和嘌呤环的重叠面积。

5.9.4 反向重复序列

反向重复序列又称回文结构、十字结构、旋转对称。如 $\begin{matrix} 5' & \text{CCGCGG} & 3' \\ 3' & \text{GGCGCC} & 5' \end{matrix}$, 此种结构已知往往是限制酶的识别位点, 容易转化成发夹结构。

5.9.5 Cot 值与基因组大小

DNA 的变性与复性是一个双链 $\xrightleftharpoons[k_2]{k_1}$ 单链 (dsDNA $\xrightleftharpoons[k_2]{k_1}$ 2SSDNA) 的过程,

用二级反应动力学表示为:

$$\frac{dc}{dt} = -K_2 C^2$$

使 DNA 变性的方法很多, 最常用的是热变性。在沸水中, 当 $\text{pH} < 3$ 或 $\text{pH} > 10$ 时可实现。

当 DNA 变性时, 紫外吸收值 (260nm) 增加 (增色效应), 复性时, 紫外吸收值减小 (减色效应)。

上述中 C 为单链 DNA 浓度 (mol/L), t 为时间 (s), K_2 为二级反应常数 [$\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$]。当 $T=0$, $C=C_0$ 时, 将上式积分并重排得到:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + K_2 C_0 t}$$

以 $\frac{C}{C_0}$ 对 $C_0 t$ 做图可到 $C_0 t$ 曲线。

当 $\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2}$, 即反应进行到一半 ($t = \frac{1}{2}$) 时, $\frac{1}{2} = \frac{1}{1 + K_2 C_0 t}$, 即 $C_0 t = \frac{1}{K_2}$, 此时 $C_0 t$ 值定义为 $C_0 t_{1/2}$ 。

实验指出, 复性的反应速度常数 K_2 与 DNA 复杂度成反比, $K_2 \propto \frac{1}{\text{复杂度}}$, 则

$$Cot_{1/2} = \frac{1}{K_2} \propto X$$

X 表示 DNA 分子序列的复杂度，如果 DNA 分子均为非重复的核苷酸对，复杂度最大，X 的值与 $Cot_{1/2}$ 的关系是 $X = K_2 Cot_{1/2}$ ，X 的单位为核苷酸对。

5.9.6 编码蛋白质、tRNA、rRNA 的序列和非编码序列的特点

什么样的 DNA 序列才能为蛋白质编码，什么样的 DNA 序列能为 rRNA、tRNA 编码，至今尚无系统解释。目前已知的 DNA 编码蛋白质的序列是从遗传密码的认识中得知的，要直接从 DNA 序列中看出这些差异还很难，尤其是非编码序列的特点了解更少，但对非编码的序列中的调控序列如启动子、衰减子、增强子的一级结构特点有初步认识。担负调控的序列中也编码蛋白质，但这些蛋白质并非是结构蛋白，而是调节蛋白，仅仅通过 DNA 序列来影响同一分子，甚至不同分子的作用机理至少与 DNA 序列的碱基组成，线性排列和空间结构有关，如衰减子、终止子发挥作用均与这些序列的空间结构有关。

5.10 核苷酸代谢

核苷酸代谢的意义主要是提供生物体内各种磷酸化物质，包括核酸生物合成所需的核苷酸，糖、脂代谢的主要活化中间物如 UDPG、CDP 二酯酰甘油，高能化合物如 ATP，维生素辅酶如 NADP、FAD，调节物质如 cAMP，核苷酸类调味品和药物。核苷酸代谢与能量代谢关系不大。

5.10.1 核苷酸的分解代谢

核苷酸分解的最终产物是 CO_2 、 H_2O 、 H_3PO_4 、 NH_3 。核苷酸的分解实际上是碱基的分解。碱基的分解因生物种类不同分为彻底分解和转化成其他中间物两种方式。以人为例，嘌呤碱基的分解在人体中不开环，实质是一个嘌呤环不断加氧氧化的过程，最终产物为尿酸。腺嘌呤和鸟嘌呤的共同分解中间物为黄嘌呤。嘧啶碱基分解一般要开环。嘌呤和嘧啶碱基分解过程一般不涉及释放能量，自然界各种生物一般不以核苷酸分解作为获能途径。

5.10.2 核苷酸的生物合成

核苷酸的生物合成主要是碱基的合成。核苷酸的生物合成所需的碱基既可是

分解过程获得的碱基，也可从无机物和其他有机物从头合成。核苷酸生物合成的原料除核糖外，主要来自氨基酸及其代谢中间物。核苷酸生物合成的共同起始物为 5'-磷酸核糖焦磷酸 (PRPP)。嘌呤类核苷酸生物合成从 PRPP 开始，先合成嘌呤环的小环，后合成大环；嘧啶类核苷酸生物合成是先合成嘧啶环，然后和 PRPP 结合。PRPP 掺入核苷酸之前是 α 型的，掺入之后转为 β 型。存在核苷酸中的核糖均为 β 型。PRPP 为核苷酸生物合成同时提供了核糖和磷酸。

嘌呤环是由 Gln、Gly、Asp、 CO_2 、 N^5 ， N^{10} - CH_2 - FH_4 、 N^{10} - CHO FH_4 合成的。嘧啶环是由 Asp 和氨基甲酰磷酸合成的。氨基甲酰磷酸是由 CO_2 、 NH_3 合成的。必须充分注意到，氨基甲酰磷酸也是尿素合成的中间物。在真核生物中，有两个不同的氨基甲酰磷合成酶，一个在线粒体 (I 型)，用于合成尿素，另一个在胞液中 (II 型)，用于合成嘧啶碱基。

在高等生物细胞中，嘧啶碱基生物合成所需的前三个酶 (氨基甲酰磷酸合成酶、天冬氨酸转氨甲酰酶和二清乳清酶) 同在一条多肽链上。大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰酶由 12 条肽链组成，每 3 个催化亚基多肽链组成一个催化亚基，每 2 个调节亚基多肽链组成一个调节亚基，2 个催化亚基和 3 个调节亚基共同形成一个具有别构能力的球体。此酶的别构调节能力是研究酶的别构调节的典型。

脱氧核苷酸是由核糖核苷二磷酸还原而来的，催化这个反应的酶属铁—硫蛋白类。核糖 2' 位上脱下的氧和来自 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 的一对氢结合而生成水。脱氧胸苷酸是由脱氧尿苷酸甲基化而来的，甲基供体为 N^5 ， N^{10} -亚甲基四氢叶酸 (N^5 ， N^{10} - CH_2 - FH_4)。

ATP 是 NAD、FAD、CoA 生物合成的共同前体。

尿酸形成过多导致痛风病。

5.11 DNA 的生物合成

DNA 的生物合成有两种方式，一是 DNA 复制，二是反转录。

DNA 的复制是半保留复制、不连续复制，目前了解的知识包括 DNA 复制半保留、不连续实验证据，DNA 复制的起点和方向，DNA 复制所需的酶和其他条件，DNA 复制的步骤、准确性与突变。

5.11.1 DNA 的半保留复制

子代 DNA 的一条链是母体的，另一条是新合成的，这种复制方式由沃森和克里克提出，后经 Meselson 和 Stahl 在 1958 年用 ^{14}N 和 ^{15}N 标记及密度梯度离心技术证实。

DNA 的不连续复制, 由于已知的 DNA 复制酶只能由 5' 向 3' 方向聚合脱氧核苷酸, 出现了母体 DNA 其中一条链复制方向矛盾。1968 年, 冈崎用³H 标记的脱氧胸苷的密度梯度离心技术证实 DNA 复制时分段进行——不连续复制。

5.11.2 复制的起点与方向和速度

原核生物和真核生物 DNA 复制的共同点之一是双向性, 即从一起点开始, 等速向两个方向进行。不同点在于原核生物的复制起点只有一个, 而真核生物有多个。原核生物复制起点少但复制速度快, 真核生物复制起点多但复制速度慢, 总体速度比原核生物快。

从一个起点到一个终点所包含的 DNA 区域叫做一个复制子。真核生物 DNA 为多复制子结构。

研究和证实 DNA 复制起点、方向和速度的实验方法主要是同位素³H 标记外加放射自显影和电镜观察, 由于 DNA 的碱基以含 T 为特征, 故常用³H 标记的胸苷来进行。

在半保留复制总方式之下, 同时有 θ 模型、滚环模型的和 D 环模型等, 这些都是以环状 DNA 为研究对象而得出的模型。大肠杆菌为 θ 型, 某些病毒为滚环型, 线粒体 DNA 为 D 环型复制。

大肠杆菌、部分病毒和噬菌体 DNA 一级结构已了解得深入细致, 对它们的 DNA 复制起点有了清楚的认识。大肠杆菌 *Oric* 序列是其惟一的起点, 由 245bp 组成, 主要特点是富含 AT (56%), 另有 11 个 GATC 序列, 与 A (腺苷) 的甲基化有关。 λ 噬菌体的复制起点由 3 部分组成: 4 个高度保守的 19bp 的正向重复序列 (*Ori* 重复序列)、约 40bp 的富 A/T 序列、28bp 的回文序列。

真核生物染色体复制起点有多个, 已知酵母的自动复制序列 (ARS) 相当于真正的起点, 同样富含 AT。对 SV40 的起点也有初步的认识。

复制终点了解很少。

DNA 复制的基本特点: ①复制是半保留的; ②细菌和病毒从一个起点开始, 真核生物有多个起点; ③复制的方向以双向为主; ④DNA 聚合酶只能从 5'→3' 方向延长 DNA 链; ⑤复制是不连续进行的; ⑥复制过程需要 RNA 引物; ⑦复制有多种机制, 环形 DNA 有 θ 、滚动环和 D 环等方式; ⑧复制过程存在校对和修复系统; ⑨复制的准确性是有限的; ⑩复制的基本原理是碱基互补。

以上内容主要是有关 DNA 顺序不变的研究。可变和促变的研究内容更多。

5.11.3 DNA 复制酶类和蛋白质

DNA 复制需要 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、解螺旋酶、DNA 连接酶、旋转酶等。根据这些酶和蛋白质分布的特点, 首先以真核生物和原核生物进行划分, 真核生物又以细胞器再划分。

原核生物 DNA 聚合酶已知有 3 种。1957 年, Arthur Kronberg 首先发现 DNA 聚合酶 I, 后来相继发现了 DNA 聚合酶 II 和 III, 简写为 polI、polII、polIII。polIII 被认为是 DNA 生物合成的主要酶。

polI 研究得最为深入, 此酶为一条链, 约 100 个氨基酸残基, 内含 Zn^{2+} 、*polA* 基因编码。用枯草杆菌蛋白酶处理此酶后得到 2 个肽段, 大片段称为 Klenow 片段, 靠近 C 端, 具有 $5' \rightarrow 3'$ 聚合和 $3' \rightarrow 5'$ 外切活性, 此片段曾广泛用于 DNA 测序, 所含的 2 个 Zn^{2+} 参与酶活性中心作用。polI 具有 6 个结合位点, 分别为模板 DNA 结合位点、引物 RNA 结合位点, 引物 $3'$ -OH 位点、底物 dNTP 结合位点、 $5' \rightarrow 3'$ 外切位点和 $3' \rightarrow 5'$ 外切位点。长期的研究证实, 此酶主要担负校对和修复功能。缺口翻译是指当 DNA 链出现某个磷酸酯键断裂(缺口)时, 此酶能使缺口处原有的 DNA 链从 $5' \rightarrow 3'$ 水解, 同时又从该缺口处重新合成一条新链。DNA 的体外标记主要来自此酶的这一能力。这种标记是在链内进行标记。

polII 于 1970 年发现, 是目前 DNA 聚合酶中了解最少的一种, 此酶单肽链, 无 $5' \rightarrow 3'$ 外切能力, 聚合能力仅为 polI 的 5%。

polIII 多亚基, 易分离, 初步认为有 7 种亚基, 且含有 Zn^{2+} , α 、 ϵ 和 θ 亚基组成全酶的核心酶。此酶被认为是 DNA 复制的主要酶。同时具有 polI 的各种活性。

1967 年发现, DNA 连接酶能将 DNA 链上的 $5'$ 磷酸基和 $3'$ 羟基脱水生成酯键, 需要 DNA 模板和能量, 原核生物以 NAD 供能, 真核生物以 ATP 方式供能, 此类酶在 DNA 重组研究中广泛使用。目前主要来自 T_4 噬菌体和大肠杆菌, T_4 DNA 连接酶为一条肽链分子量 68000, 其基因也已用于 DNA 重组。

DNA 复制时需要 RNA 作为引物。故 RNA 合成酶又称为引物酶。原核生物所需 RNA 引物仅 2~5 个核苷酸长。DNA 复制为什么需要 RNA 为引物, 目前的解释是 DNA 复制酶 polI 和 polIII 上有 RNA 引物位点, 进一步的原因有待研究。DNA 复制所需的 RNA 合成酶不同于转录时的 RNA 合成酶。具体差异也不清楚。

解旋酶促进 DNA 双链分离。解旋酶是拓扑异构酶 I 型中的一类, 已知有两类解旋酶, 一类是结合在后滞链模板上, 以 $5' \rightarrow 3'$ 方移动, 另一类是 Rep 蛋白, 和前导链结合, 以 $3' \rightarrow 5'$ 方向移动。解旋酶具有 ATP 酶活性, 利用 ATP 供能而

导致自身构象变化。

旋转酶即拓扑异构酶 II，此酶能同时断裂连接双链 DNA 链，需要 ATP 供给能量，已知有两个亚类，第一亚类是 DNA 旋转酶，主要功能是引入负超螺旋，在 DNA 复制中起着十分重要的作用，此酶仅在原核生物中发现，第二亚类转变超螺旋 DNA 成为没有超螺旋的松弛形式，也需要 ATP，在原核、真核生物中都有发现。拓扑异构酶 II 无碱基序列特异性，该酶由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成。随着复制的进行，天然负超螺旋逐渐减少，直至产生正超螺旋，旋转酶此时发挥消除正超螺旋的作用，使正超螺旋转化为负超螺旋。

经旋转酶和解链酶作用后分开的双链被单链结合蛋白 (SSB) 结合后暂时稳定下来供复制，此蛋白由 4 个相同亚基组成。

真核生物的 DNA 聚合酶已知共有 5 种 (α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ)，和原核生物 DNA 聚合酶相比，除 δ 外，其余无外切能力， δ 聚合酶具有 $3' \rightarrow 5'$ 外切能力；共同之处在于聚合的方向为 $5' \rightarrow 3'$ ，需要 RNA 引物。目前认为， α 酶是真核生物主要的复制酶，其次是 δ 和 ϵ 。

此外，真核生物也有连接酶、解旋酶、引物酶等，但研究的水平远不如原核生物。

5.12 DNA 损伤、突变、人工诱变、癌变

大多数教科书常将遗传病和 DNA 的修复划分为两个或者三个部分来讨论，由于内容重复，造成许多误解，其实它们是一个问题的不同方面而已，这个问题说到底就是 DNA 序列的变化。DNA 序列的可变性是绝对的，不变才是相对的。改变了的 DNA 序列有可能永久存在下去，或只能存在很短时间，甚至刚刚出现即被纠正过来。变与不变不能都以是否有害或有利来判定。DNA 序列的可变性是物种形成和增加的基础，而不变的相对稳定是物种稳定的基础。通常将 DNA 序列可修复的变化叫做损伤。损伤主要是 DNA 序列在复制过程中在一条链上经修复系统改正的 DNA 序列的变化。突变是可以通过复制而遗传给子代的永久性 DNA 序列改变，这些可遗传的 DNA 序列的改变逃脱或躲过了修复系统，两条链都发生了改变，使某个或某些基因发生了改变，突变的后果有的是致死的，有的是非致死的，甚至是有益的，只有非致死的突变才能永久遗传。

导致 DNA 序列改变的因素有：①紫外线、电离辐射作用，最常见的是胸腺嘧啶在同一条链内形成共价二聚体。②化学物质，如亚硝酸类、烷化剂、嘧啶类化合物。亚硝酸导致碱基氧化脱氨 ($A \rightarrow I$)，($C \rightarrow U$)。烷化剂如乙基硫酸乙酸 (ESE)、乙基硫酸甲酯 (EMS)、亚硝基胺类、亚硝基胍类等，可使碱基烃基化、磷酸基烃基化。甲基化是最常见的烃基化方式之一。一些正常碱基的类似物可冒

充正常碱基而掺入，如 5-氟尿嘧啶 (BU)、2-氨基嘌呤 (AP) 等，这些物质有些是抗癌药物。嵌合剂如吡啶橙、吡黄素、原黄素等吡啶素染料分子均含有吡啶稠环，此种三环分子可以嵌合到 DNA 碱基对之间，由此导致含有这种染料分子的 DNA 复制时常可以插入一个或两个碱基。③转位成分。④内在因素，如 pH、温度和离子浓度等改变容易导致碱基脱氨基，甚至脱嘌呤和脱嘧啶。⑤染色体畸变，如染色体部分缺失、易位、倒位、重复。⑥罗伯逊变异，即染色体的融合和裂解。

DNA 修复机制已知有光修复、切除修复、重组修复和 SOS 等修复功能。

光修复 1949 年发现，400nm 左右的可见光可激活光复合酶，此酶高度专一切割因紫外线产生的嘧啶二聚体。高等哺乳动物没有这样的酶。

切除修复 在内切酶、外切酶、连接酶和聚合酶协同作用下，以完整的一条链为模板进行的一种普遍存在的修复。这种修复系统的缺陷导致癌症，如着色性干皮病。

重组修复 又称为复制后修复，前面所述的切除修复均为复制前修复，损伤未除去已经复制使下一轮复制出现障碍，经重组修复系统如重组基因 *recA*、*recB* 和 *recC* 分别编码的蛋白质和酶以及聚合酶和连接酶协作完成修复。真核生物的重组修复系统有待进一步研究。

细菌的限制聚一修饰系统 生物有消除损伤的一面，也有预防损伤的一面，限制性内切酶不能用于细菌自身的 DNA。已知的原因是细菌有使自己的 DNA 甲基化而使限制性内切酶位点失效的修饰性甲基化酶，但对外来的 DNA 因无这种保护，自然会被限制性内切酶切割。大多数大肠杆菌含有两种 DNA 甲基化酶，*dam* 和 *dcm*。*dam* 可使 5' GATC3' 中 A 的 N₆ 位甲基化，*dcm* 可使 5' CCAGG3' 或 5' CCTTGG3' 中的 C₅ 甲基化。

SOS 修复 细胞 DNA 出现损伤或复制受到抑制而诱导产生的修复。SOS 反应是由 *RecA* 蛋白和 *lexA* 阻遏物相互作用引起的。此反应广泛存在于真核生物和原核生物。此反应不仅有 DNA 修复作用，而且系统变异。有些致癌物质正是通过 SOS 反应的诱导而产生癌变的。

已知衰老与 DNA 损伤修复能力下降有关，修复能力与寿命成正比。许多先天性遗传病均存在修复系统缺陷，如皮肤癌、淋巴瘤、白血病等疾病经常是由于个别修复酶缺陷而导致的。

定向突变又称离体定向诱变。在对 DNA 复制过程中损伤和修复机理有了一定认识之后，创造有益的变异成为一种与应用紧密相关的需求。一般的经典的诱变产生的突变不能满足人们按照预先设计的 DNA 顺序自如地操作。减少随机性，主动改造已有的 DNA 顺序，并获得稳定遗传已成为当今分子生物学为经济建设服务的突破口。

必须搞清楚定向突变和 DNA 重组的区别。定向突变的变异单位是一个碱基, DNA 重组制造变异的单位是一个基因或数个基因, 是一段 DNA 顺序, 是在不改变原有 DNA 其他顺序的基础上不同来源的代表一个或数个基因的片段的重新组合。什么时候采用定向突变, 什么时候采用 DNA 重组, 取决于创造变异的目的。蛋白质工程, 包括酶工程, 通常是对已有的蛋白或酶的基因进行一个或几个氨基酸残基的修改。如增加必需氨基酸的含量, 以获得高效的营养物质; 或增加酶的耐性 (抗热、抗酸碱等), 以提高酶的寿命和使用范围; 药物设计通常为了增加或改进和靶细胞、靶分子的结合位点, 或提高药物的扩散、渗透能力, 延长在生物体中的寿命, 研究个别氨基酸残基酶活性和蛋白质空间结构形成中的作用等。但为了创造一个新物种, 改变某物种的性状, 如为了使棉花抗棉铃虫、小麦抗黑穗病等, 需要将原本存在于另一个物种或品种的此类抗性基因移植到棉花和小麦中, 这就需要 DNA 重组。DNA 重组的结果当然也可用于蛋白质工程。一个基因的一个碱基或数个碱基改变了, 其结果等于是一种重组, 使被诱变的细胞获得了新的基因。但严格说来, 这是一种遗传重组而非基因重组。诱变是一种方法, 定向诱变是诱变方法中的一类。突变是一种结果, 是指一种在核苷酸序列上出现的可稳定遗传的变化。为了达到这一变化, 早期人们采用经典诱变。经典诱变产生的突变的随机性和大量筛选的繁杂过程, 已使人们基本上开始放弃这一方法, 定位诱变有如下几种: ①缺失诱变, 从目的 DNA 序列中除去一部分序列, 所得突变体 DNA 比原来 DNA 短; ②插入诱变, 将一段外原 DNA 插入到目的 DNA 序列中产生突变; ③利用寡核苷酸诱变, 这一方法被认为是真正的定位诱变。上述两种方法尚不具备这一特点。一般教科书中所指的定位诱变即指利用寡核苷酸产生的诱变。这一方法的基础在于 DNA 的测序技术、DNA 的化学合成和分子杂交技术。此方法的原理是根据已知的目的基因序列, 选定要改变的碱基种类和位置, 然后用化学方法合成一段一个或几个碱基不同的目的基因片段, 被改变的碱基位于化学合成的这一片段的中间, 其两侧的序列和原来的基因进行杂交, 之后用 DNA 聚合酶延长杂交的寡核苷酸片段, 或用 PCR 技术达到这一目的, 再将这样内含突变碱基的片段导入宿主进行克隆。在证实突变重组体成功之后, 回收这一片段并用等位基因代换方法正式取代原来的目的基因。当然, 这也有一个筛选过程, 但筛选的任务较轻。

寡核苷酸诱导的定位突变分两种, 一种是用 M13 做载体, 另一种用双链 DNA 质粒做载体。如果要获得单链的突变的目的 DNA, 以 M13 做载体。当寡核苷酸和 M13 单链 DNA 杂交时, 由于寡核苷酸中人们引入了错配的、插入的或缺失的碱基, 杂交反应通常在较低的温度下进行, 经 DNA 聚合酶作用, 以这个寡核苷酸为引物, 双向复制之后经连接酶将两端相连。这样的双链 M13 噬菌体导入大肠杆菌后, 经复制便可获得稳定遗传的突变的 DNA 克隆。通过筛选而获

得突变的 DNA 分子，并可用等位基因代换的方法进而送回原来细胞的基因组中。如果要获得双链突变的目的 DNA，则选用双链 DNA 的质粒做载体。质粒的双链 DNA 开环后，在两个限制酶的切点之间加入突变的目的 DNA，导入大肠杆菌后筛选获得突变 DNA 克隆。

在对定向诱变有了一定的了解之后，回头再分析这一诱变的过程和产生的突变结果，不难看出，所谓定向或定位诱变，就是用人工设计的某些碱基（至少一个）已改变的目的基因去替换原来的目的基因，诱变的过程可概况为：人工合成含有设计好的突变位点的寡核苷酸片段→杂交并复制成为含突变位点的目的基因→DNA 克隆→取代原有的基因。

5.13 基因重组的原理

在理解了 DNA 复制、DNA 损伤与修复、诱变与突变之后，不仅认识到 DNA 序列的保守性即不变性，而且对 DNA 序列的可变性有了一定的认识。在此基础上，进而认识基因重组就容易多了。基因重组、遗传重组、DNA 重组 3 个概念的关系很难理顺，往往被认为是一回事，主要原因在于 3 个概念针对的都是 DNA。三者之间的差别在于：遗传重组是发生在遗传过程中的自然界原本存在的导致变异的一种现象；DNA 重组是人们根据遗传重组利用限制性内切酶在体外对 DNA 进行的人工操作，在自然界一般不能自发实现；基因重组是指遗传重组和 DNA 重组的结果和目的，无论是利用自然的（遗传重组）还是人工的（DNA 重组），最终目的是要实现基因重组。从操作对象是 DNA 说来，DNA 重组是本质和根本的。所以，DNA 重组在广义上包括了遗传重组和基因重组。限于目前对真核生物 DNA 序列了解的还不全面，DNA 重组没有达到基因和非基因均进行完全自由重组的地步。由于应用领域的紧迫需求，目前的 DNA 重组的目的主要是基因重组。能够重组的基因也很有限，但会逐步扩大。

5.13.1 遗传重组

为了全面了解基因重组，首先要对遗传重组有了解。遗传重组是指自然出现的不同 DNA 链断裂并连接成新的 DNA 分子。新的 DNA 分子含有不同亲本的 DNA 片段。新加入的片段可以是一个编码有某种蛋白质、酶或 RNA 的基因，也可能是一些非编码的序列，或者是编码了迄今尚不了解的信息。遗传重组划分的方法有多种，如根据新加入的 DNA 序列和原来处在同一位置的 DNA 片段顺序的相同与否，可以划分为同源重组和非同源重组。后者又根据位点是否专一划分为位点专一重组和非常规重组。同源重组也称一般重组，在生物中广泛存在，重

组双方的 DNA 有广泛的同源性或相似性，在大肠杆菌中需要 *recA* 基因、*recB* 基因、*recC* 基因、单链结合蛋白、DNA 旋转酶、核酸酶以及其他复制酶参加。同源重组的机理常以 Holliday 的 8 字型模型来解释。专一位点重组发生在两个 DNA 分子的专一位点。专一性位点往往在末端。 λ 噬菌体的双链线状 DNA 的两个末端的各 12 个碱基的单链突出可以互补（黏性末端）。由此可以插入到大肠杆菌染色体的 *gal* 和 *bio* 两个基因位点之间，从而实现整合。这一过程由拓扑异构酶 I 催化。连接酶能使 DNA 单链断裂和重接，此外还需一种寄主基因编码的蛋白因子（IHF），但无需 *recA*、*recB*、*recC* 参加。非常规重组也叫异常重组，主要是指转座因子或曰转位因子，包括 *SI*、*Tn* 和 *M13* 噬菌体等。转座涉及到转座因子的复制，当一个拷贝插入到基因组的新位置时，原来的位点仍然保留有原拷贝，所以转座和上述各种遗传重组的最根本的区别在于纯属于 DNA 片段从一处移向另一处。

5.13.2 细菌的重组

遗传重组在自然界存在的另一类形式见于细菌，包括转化、转导和接合三种。转化是指受体细胞接受了供体的 DNA，从而获得另一细胞遗传性状的过程，如肺炎球菌转化实验。转化的条件是自然条件和细菌之间，高等生物只能进行人工转化。转化的结果是供体的双链 DNA 中的一条链片段置换了受体染色体双链 DNA 的同源部分。转导是指供体细胞的基因通过噬菌体而转移到受体细胞中，转导在供体的双链 DNA 片段和受体的完整 DNA 双链之间进行重组。接合则是细胞之间直接接触导致 DNA 从一个细胞移至另一个细胞。DNA 被转移是由于结合质粒，如 F 因子，先后进入两个受体细胞，将前一个细胞的 DNA 单链片段转移给后一个受体细胞。转导和接合都需要 *recA*、*recB*、*recC* 和 *recD* 的基因产物协助。

从上述各种遗传重组的过程和结果中，可以总结出以下几点：①遗传重组是自发的、自然界本来存在的一种 DNA 重组现象。②遗传重组的结果有两种：单链交换或替换；双链替换。同源重组、专一位点重组、转化和接合属于单链交换或替换。而转座子、转导则是双链之间的替换或连接。③遗传重组中的同源重组、转导和接合已知需要 *recA*、*recB*、*recC*、*recD* 基因产物协助。专一位点重组、转化、转座过程所需酶各异或不详。④除了同源重组发生在完整的双螺旋 DNA 分子之间外，基本的和普遍的遗传重组是在 DNA 片段（单链和双链）和完整的 DNA 分子之间进行的。

5.13.3 DNA 重组

在对自然界自发进行的 DNA 重组（遗传重组）有了基本了解之后，创造新的，超自然的重组是必然的发展结果。狭义的 DNA 重组就是人工 DNA 重组技术，是在体外进行的用限制性内切酶等工具对 DNA 进行的人工操作。这一技术是按照人们设计的方案将不同的 DNA 片段定向连接，目的在于大量生产多肽物质，定向改造生物基因组结构和用于基因调控等基础研究。

(1) DNA 重组的步骤

DNA 重组的步骤包括：①外源 DNA 与载体连接并形成重组 DNA；②通过转化或感染将重组 DNA 引入受体细胞；③筛选含有重组体的克隆。

从上述步骤可以看出，所谓 DNA 重组，就是人工创造一条染色体，专一地编码和合成人们所需的某种物质。外源 DNA 担负的作用是编码所需的物质。载体的作用是携带外源 DNA 或曰目的 DNA 进入宿主，同时提供外源 DNA 复制起点、转录启动元件、筛选标记和用于克隆的限制酶位点。宿主的作用是提供外源 DNA 表达条件，提供复制、转录和翻译等过程所需的各种酶、辅因子底物、pH 等，使外源 DNA 能高效表达。

外源 DNA 来自化学合成、从基因文库和 cDNA 文库挑选等。载体来自细菌和酵母的质粒、噬菌体、病毒和人工构建的载体。宿主有最早和最广泛使用的大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞（猴细胞、鼠成纤维细胞）和植物细胞（烟草、牵牛花、小麦等）等。

(2) 外源 DNA 的来源和要求

外源 DNA 是 DNA 重组的目的 DNA。通过目的 DNA，人们要将所需的各种能够编码在 DNA 分子上的物质的遗传信息额外加入宿主细胞中，使宿主加倍合成这些物质。所以目的 DNA 或目的基因不含多余成分，高纯度，片段大小适合重组操作。外源 DNA 获得办法主要基于 DNA 测序技术和化学合成方法的不断改进。从本世纪 70 年代起，化学合成方法日趋完善，从几十个碱基到上千个碱基对的目的基因已经化学合成。目前 DNA 化学合成较大的片段时需要 DNA 连接酶。化学合成的方法有磷酸二酯法、磷酸三酯法、亚磷酸三酯法。超过 200bp 的 DNA 需要分段合成，然后再相连成完整基因。

(3) 基因分离

许多能够编码在 DNA 中的物质，因生物合成过程的多次加工和运输，仅靠用遗传密码推断出基因结构有难度。特别是真核生物的基因内部的调控结构，如启动子、内含子等，实际上无法直接从染色体上的 DNA 中获得，由此产生了基因分离的两个方法。①基因库，也叫基因组文库，是指用克隆的方法将一种生物

的全部基因组长期以重组体方式保持在适当的宿主中。某种生物细胞基因组的 DNA 经限制酶切割, 然后与合适载体重组并导入宿主中, 这样保存的基因组是多拷贝、多片段, 当需要某一片段时, 可以在这样的“图书馆”中查找。②基因文库, 也叫 cDNA 文库。首先获得 mRNA, 反转录得 cDNA, 经克隆后形成文库。cDNA 文库和基因文库的不同之处在于, cDNA 文库除去了 mRNA 拼接过程中除去的内含子等成分, 便于 DNA 重组的使用。为了获得目的基因而首先采取建文库的过程, 实际上等于是增加了基因或 DNA 重组的面或量, 自然也就增加了筛选的面和量。

(4) 载体

根据携带的目的 DNA 片段大小, 和将来要进入的宿主的不同而选用不同的载体。

用于原核生物宿主的载体有: ①大肠杆菌质粒。双链环状 DNA, 1~200kb, 常用的载体为松弛型、非接合型的质粒。如 pBR322 由人工改造而来, 有一个复制起点、一个抗氨苄青霉素基因、一个抗四环素基因、多种限制酶切点, 可容纳 5kb 左右外源 DNA。②噬菌体。内含双链环形、单链环形、双链线形、单链线形等多种 DNA, 大小不一, 高感染率。 λ 噬菌体为双链线形 DNA, 因野生型内含限制酶切点多而常采用改造后的变种。charon 系列有插入和替换型两种, 带有来自大肠杆菌的 β -半乳糖苷基因 lacZ。M13 为单链环状 DNA, 改造后的 M13 mp8, 加入了大肠杆菌的 lac 操纵子, 常用于核酸测序。③人工载体。用于原核生物宿主的人工载体大多出自综合大肠杆菌质粒的抗药性和噬菌体的强感染力, 同时满足携带真核生物的目的基因大片段 DNA。如柯斯质粒是将 λ 噬菌体的黏性末端 (cos 位点序列) 和大肠杆菌质粒的抗氨苄青霉素和抗四环素基因相连而获得的人工载体, 含一个复制起点、一个或多个限制酶位点、一个 Cos 片段和抗药基因, 能加入 40~50kb 的外源 DNA, 常用于构建真核生物基因组文库。

用于真核生物宿主的载体有: ①酵母质粒。酵母的 2μ 质粒来自酿酒酵母。内含复制起始区 (ori) 和能够使质粒在供体中稳定存在的 STB 序列。此质粒双链环状, 6813bp, 与原核生物的质粒不同, 2μ 质粒常被组蛋白包围。②酵母人工载体。由于酵母 2μ 质粒在使用过程中的局限性, 人们构建了多种质粒。整合质粒 (YIP) 由大肠杆菌质粒和酵母的 DNA 片段组成, 可与受体或宿主的染色体 DNA 同源重组, 整合进入宿主染色体中, 故只能以单拷贝方式存在, 常用于遗传分析。复制型载体 (YRP) 同样由大肠杆菌质粒和酵母 DNA 片段组成, 但酵母 DNA 片段不仅提供抗性基因筛选标志, 而且带有酵母的自主复制顺序 (ARS)。由于大肠杆菌质粒本身也有一个复制点, 所以这类质粒既可在大肠杆菌, 又可在酵母中复制和存在, 故称为穿梭载体。通过穿梭载体, 人们可首先在大肠杆菌细胞中大量扩增真核基因, 然后再转入酵母进行表达。附加体型载体

(YEP) 由大肠杆菌质粒、 2μ 酵母质粒和酵母染色体的选择标记构成。由于 2μ 质粒内含自主复制起点 (ori) 和使质粒在酵母细胞中稳定存在的 STB 区, 所以这类载体在酵母细胞中独立存在。上述三种类型的人工质粒都含有酵母细胞染色体 DNA 片段, 相当于一条酵母人工染色体 (YAC), 但整合型的质粒进入宿主后并不单独存在。原核生物宿主的载体都是单独存在的。

用于植物宿主的载体: 由于植物细胞的特殊结构, 外源基因导入植物细胞的方法目前还很有限。①Ti 质粒。Ti 质粒是土壤农杆菌的质粒。土壤农杆菌通过植物伤口侵入植物后, Ti 质粒的 T 区整合到植物染色体中。T 区的 DNA 长约 20kb, 它携带的基因有两个功能: 一是决定植物形成冠瘿瘤; 二是控制冠瘿碱的合成。所以 Ti 质粒是诱发肿瘤的质粒。Ti 质粒能够进入植物细胞并能整合到植物染色体 DNA 分子中的能力确定之后, 人们自然希望 Ti 质粒能够用作植物宿主的载体。Ti 质粒的缺点是 DNA 分子太长 (200kb, 环状双链) 和限制酶切点多, 导致宿主产生冠瘿瘤而成为不分化的不良植株。解决 Ti 质粒 DNA 分子太长的办法是人们仅选其 DNA 分子的核心部分——T 区。T 区的 DNA 能自发整合到植物染色体 DNA 分子中。解决诱发肿瘤缺点的方法是使 T 区的抑制细胞分化的部分产生突变。具体做法有两种: 整合型法和双载体系统法。整合型法用限制酶将完整 Ti 质粒中的 T-DNA 切去并分离出 T-DNA, 并用 PBR322 取代 T-DNA 中编码致癌的基因和冠瘿碱基因, 再将目的 DNA 插入到这一重组 Ti 质粒中, 由此获得杂化的 T-DNA。将杂化的 T-DNA 转入土壤农杆菌中, 此杂化的 T-DNA 和完整的 Ti 质粒发生同源重组, 结果杂化 T-DNA 取代了完整 Ti 质粒中原来的 T-DNA 区 (整合)。这种带有目的 DNA、选择标记和无致癌能力的 Ti 质粒通过土壤杆菌再侵染宿主植物, 最终使所需的 DNA 导入植物染色体 DNA 中。双载体系统法, 由两种分别含 T-DNA 和致病区的 Ti 突变质粒构成。第一种是将杂化的 T-DNA 插入到一种质粒中, 这种质粒小, 可提供单酶切位点; 第二个除了不含 T-DNA 外, 其余和完整 Ti 质粒相同, 当这两种质粒共存于农杆菌中时, 由于功能互补 (但并未取代), 杂化的 T-DNA 仍能整合到植物细胞的染色体 DNA 分子中。②植物 DNA 病毒。已知以 DNA 为遗传物质的植物病毒有花椰菜花叶病毒、雀麦条纹病毒和双生病毒。这些病毒因宿主范围窄、可插入片段很短、易丢失、插入外源 DNA 后感染力下降等原因, 至今使用很少。③植物转座子。转座子能在植物基因组中频繁转移, 有望成为一种新的植物载体。

用于动物宿主的载体: 哺乳动物细胞用于外源 DNA 表达所采用的载体至今很有限, 目前主要是用猿猴空泡病毒 40 (SV40)。SV40 病毒内含双链环状 DNA, 5243bp, 只能插入 2.5kb 的外源 DNA, 感染宿主主要为猴细胞, 容易在使用过程中发生重组而产生有危险性的野生型。改造后出现的 SV40 病毒载体有两大类: 一类是取代型, 外源 DNA 直接插入在缺陷型的病毒基因组中, 为了弥

补被取代的这部分 DNA 的功能，必须同时使用一种与之互补的辅助病毒；另一类是病毒—质粒重组型，将病毒基因组中维持其在哺乳动物中复制的序列分离并和细菌质粒重组，这类质粒在大肠杆菌和哺乳动物细胞中均可复制，属于穿梭载体。用于哺乳动物宿主的病毒载体还有 RNA 病毒、痘病毒、人腺病毒、乳头瘤病毒等。

通过对现有各种 DNA 重组技术中采用的载体的了解，可以从中发现，作为 DNA 重组的载体，一般具备以下条件：①能够进入宿主细胞。载体能够进入宿主细胞的原因是本身很小。和宿主的染色体 DNA 分子相比，载体的大小显得微乎其微。如细菌的质粒一般为 1~200kb，而大肠杆菌细胞的 DNA 分子为 4×10^6 bp，质粒仅占大肠杆菌 DNA 分子的 1/20。SV40 的 DNA 分子量为 3×10^6 Da，而高等生物染色体 DNA 分子量一般都在 1×10^{12} Da 以上，前者仅占后者的 $1/(3 \times 10^5)$ 。载体能够进入宿主细胞的另一个原因是目前已知的这些载体均不具备独立生存的能力，载体本身是以 DNA 或 RNA 为主，甚至全为 DNA 或 RNA，而且是一个分子结构。载体进入宿主细胞，相当于一个分子进入细胞。②载体可以在宿主细胞中独立复制，即本身是一个复制子。一个载体必须在其 DNA 分子中包含复制起点，利用自己编码或借用宿主的复制酶进行复制，否则就不能在宿主细胞中长期存在下去。当外源 DNA 插入时，插入外源 DNA 片段的大小和插入的量都不能破坏载体原有复制能力。人工重组后的载体可能在一个宿主细胞中起初只有一个，但经过复制后可实现多拷贝，这即是基因克隆。没有足够的外源 DNA 的拷贝数，则筛选重组体是不可能进行的，高效表达也不能很好实现。③要有筛选标记。区分重组与否要靠筛选标记来进行。携带有外源 DNA 的载体进入宿主细胞与否以及进入后复制与否全靠筛选标记提供帮助。④对多种限制酶有单一或较少的切点。最好是单一切点。限制酶切点是外源 DNA 插入、载体 DNA 开环和闭环的基础。不能用于重组的载体是 DNA 的无效载体。

当携带外源 DNA 的载体进入宿主细胞后无非以两种状态存在：其一是结合态，载体和宿主染色体 DNA 整合在一起，单拷贝，被整合的可以是载体本身加外源 DNA，也可以是一部分，但至少要将外源 DNA 整合；其二是并存，即独立存在于宿主细胞中，多拷贝。也有两种状态兼有的。哪一种状态有利要依 DNA 重组的目的而言，如果是为了稳定遗传，单拷贝的整合型为妥，如果为了基因克隆，则需要多拷贝型。

随着 DNA 重组技术的不断改进，对载体的要求正在逐步发生改变。上述基本要求主要是从原核生物 DNA 重组中得出的，到了真核生物阶段，由于将外源 DNA 引入宿主的方法有了新的改进。例如各种细胞学方法、物理方法的引进，引入外源 DNA 时已大大突破了原有的要求重组 DNA 片段的大小限制。人们迫使外源 DNA 进入宿主的能力增强了。此外，由于筛选重组体技术的改进，原来

要求载体或外源 DNA 上有选择标记已经被杂交技术、免疫学技术等替换，从而扩大了 DNA 重组技术使用的范围。因此，作为 DNA 重组的载体最基本的要求有两条：一是自主复制能力；二是可利用的限制酶切点。其他要求在有些载体中已不存在。

通过对各种载体的了解，还可以看出，DNA 重组使用的载体可以分为三大类。第一类是以繁殖 DNA 片段为目的的载体，通常称为克隆载体。这类载体较小，复制不受寄主的严格控制，即自身有很强的复制能力，在细胞内可以有很高的拷贝数，寄主的 DNA 复制停止时，这类载体仍能扩增。PBR322、PUC 系列、M13 系列载体均属于克隆载体。第二类载体为穿梭载体，既能在真核细胞中繁殖又能在原核细胞中繁殖。说明这类载体有真核细胞和原核细胞两种复制点。穿梭载体常用于真核生物 DNA 片段在原核生物中的繁殖然后再转入真核细胞宿主。第三类载体为表达载体。在基因工程中，人们通过 DNA 重组的目的是要获得表达产物。目的基因不仅要进入宿主，而且要高效表达。其要求很高，由于 DNA 重组技术已有二十余年历史，积累了大量的知识。人们对载体的要求已不仅是上述那些最基本的要求。理想的表达载体应当是：高拷贝数，具有强启动子和稳定的 mRNA，具有高的分离稳定性和结构稳定性，转化频率高，宿主范围广，插入外源基因容量大而且可以重新完整地切出，复制与转录机器应和宿主相匹配，最好是可调控的，而且在宿主不生长或低生长速率时仍能高水平地表达目的基因。完全达到这些要求的载体至今少见。例如，通用于所有宿主细胞的载体尚未实现。植物细胞和动物细胞宿主的载体还很少。特别是动物细胞，目前主要是病毒，进入宿主的目的基因多为一个基因。以基因簇或多个基因同时进行重组还有不少困难。载体携带的目的基因多了，转化频率要受影响。高效启动子发现的还不多。

从 DNA 重组的原理分析，DNA 重组技术是有一定限度的，并非任何基因都可进行 DNA 重组，实际上在应用和理论研究中也没有这种必要。一次重组中基因数也是有限的。起码不能占据宿主细胞过多空间。外来的目的基因数和宿主的遗传物质含量的比例是有限定范围的。根据 DNA 重组技术的用途的不同，挑选和构建合适的载体，协调载体和宿主之间的关系是 DNA 重组技术实际操作中经常要考虑的问题。

这里要特别注意载体这个概念的使用，通常所说的载体是指将外源或目的 DNA 携带进宿主的运载者，但在基因重组表达时，也常将表达系统——宿主称载体，要注意二者的区别，不可混淆起来。

DNA 重组使用的宿主也叫表达系统，为目的基因的表达，包括复制、转录、翻译、后加工、分泌等提供条件。因载体不同，这些表达阶段依赖于宿主的程度各异。目前已使用的宿主有三大类：①微生物表达系统，最早使用和至今最广泛

使用的是大肠杆菌,其次是酵母和枯草杆菌。大肠杆菌表达产物常以包涵体,即不正常的折叠形式存在,故无生物活力。大肠杆菌无分泌至培养液的能力,为了获得表达产物,常将菌体破碎收集,故分离过程费时费力。目前已有改进后的大肠杆菌宿主,利用病毒和大肠杆菌等的分泌机制补充大肠杆菌的外分泌能力。枯草杆菌主要用于外分泌型表达,缺点是表达产物容易被枯草杆菌分泌的蛋白酶水解。重组质粒在枯草杆菌中不太稳定。链霉菌培养方便,外分泌能力强,常用于抗生素抗性基因和生物合成基因的表达。乳酸菌用于提高食品质量。编码在质粒上的乳糖代谢、柠檬酸吸收、蛋白酶等基因与食品工程密切相关。假单胞菌用于构建环境保护所需的具有多种降解能力的工程菌。棒状杆菌主要用于氨基酸基因工程。啤酒酵母安全不致病,不产生内毒素,而且是真核生物,对其肽链糖基化系统改造后,已广泛用于真核生物基因的表达。丝状真菌的 DNA 和载体整合,用于大量生产胞外蛋白,特别是哺乳动物基因,但丝状真菌外分泌能力甚差。

②植物细胞表达系统。因在植物细胞使用的载体很有限,目前主要是农杆菌介导,故双子叶植物表达系统使用较多。

③动物细胞表达系统。哺乳动物细胞具有很强的分泌和蛋白质合成后的修饰能力,但培养条件苛刻,成本较高,且易污染。昆虫细胞既能表达原核基因,又可表达哺乳动物基因,且有较强的分泌能力和修饰能力。

关于表达系统的使用,有几个问题需要明确:①融合系统与融合蛋白。目的基因插入宿主某蛋白质的基因中形成的表达系统为融合表达系统。此系统表达的目的基因产物和宿主的蛋白质杂合在一起而形成融合蛋白。融合蛋白的形成有助于防止表达产物被宿主水解,或者还可以通过融入的宿主信号肽而分泌到体外。但融合蛋白的分离纯化比较麻烦。通常是目的基因表达产物的 N 端和宿主蛋白相融合。

②瞬时表达系统与稳定表达系统。进入宿主的目的 DNA 如果没有和宿主 DNA 整合,随着细胞生长,宿主内目的基因数量递减至消失,表达过程因此只能持续数天,这样的表达系统为瞬时表达系统。如果目的基因整合到宿主染色体 DNA 中稳定遗传,则成为稳定表达系统。以表达产物为 DNA 重组目的时,自然需要有稳定表达系统。

③高等动植物细胞为宿主时主要采用显微注射、电穿孔等物理和细胞学方法。原核细胞为宿主时采用转导、转化等方法导入目的基因。

(5) 重组体的筛选

目的基因和载体重组并进入宿主后,并非能全部按照预先设计的方式重组,由于操作的失误及不可预测因素的干扰,常常要在一群重组体克隆中寻找所需的重组体克隆。最终的一步,要通过测定所选择的重组体外源 DNA 的序列,真正确认重组成功。如何测序已经在前面叙述过。目前重组体筛选的方法很多,概括起来有三类:第一类方法是生物学方法,包括遗传学方法、免疫学方法和噬

菌斑的形成等；第二类方法是核酸杂交，通过 DNA-DNA、DNA-RNA 碱基配对筛选，以探针的使用为核心，包括原位杂交、Southern 杂交、Northern 杂交等；第三类方法是物理方法，如用电泳法等。不论哪一种筛选方法，最终目的是要证实目的基因按照人们所要求的顺序和方式正常存在于宿主细胞中。

生物学方法 ①遗传学方法。这是最早而且最广泛使用的方法。前述对 DNA 重组载体的要求之一筛选标记即是为这一方法而设计的。质粒常有抗药性基因，如四环素抗性基因 (Tet^R)、氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R)、卡那霉素抗性基因 (Kan^R)，当编码有这些抗药性基因的质粒携带目的 DNA 进入宿主细胞后，便可在内含这些抗菌素的培养基中生长。但必须清楚地认识到，筛选的目的是要证实携带有目的 DNA 的质粒存在而非是单独这类质粒存在，因为不携带目的基因的质粒进入宿主与 DNA 重组无关，为了防止这一误检，人们采用插入缺失的方法，即在体外故意将目的 DNA 插入到原质粒的某个抗性基因之中，使其失活，这样，由此得到的宿主细胞便可在内含这一抗菌素的培养基中存活，其余的被抑制或杀灭，这一方法称为插入失活检测法。在实际操作中，同一质粒往往有两种抗药性基因，其中一个插入失活后，另一个仍完整存在，故筛选时要经过二次，才能确认是其中一个抗药性基因被插入，这样就显得麻烦些。利用抗药性基因进行筛选的另一方法是直接筛选法。由于在一种质粒上往往具有两种抗药性基因，用插入失活检测法时要在分别含两种抗生素的平板上进行筛选，为了做到在一个平板上直接筛选，可将插入缺失重组后转化的宿主细胞培养在含四环素和环丝氨酸的培养基中，重组体 tet^S 生长受到抑制，非重组体 tet^R 虽能使细胞生长，但因环丝氨酸可在蛋白质合成时掺入而导致其死亡，受到抑制的重组体 tet^S 因仅仅是受到抑制，故接种到另一培养基中时便可重新生长。遗传学检测的第三种方法是营养缺陷互补。宿主细胞在营养代谢上缺什么基因，重组后进入的外来 DNA 同时补充什么基因。由此实现营养缺陷互补。如宿主细胞缺少亮氨酸合成的酶基因，有的缺少色氨酸合成酶基因，这一方法使用选择性培养基，实际上就是恰好缺少宿主细胞不能合成的那种物质。由插入失活而来的一种更直观的检测方法是 β -半乳糖苷酶显色反应。用于宿主为 $lacZ$ 基因缺陷的大肠杆菌，正常情况下大肠杆菌的乳糖操纵子中 $lacZ$ 基因编码的 β -半乳糖苷酶分解乳糖为半乳糖和葡萄糖，当用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 代替乳糖为诱导物时，如果插入的外源 DNA 使处于质粒上的 $lacZ$ 基因失活，则重组细胞不能使乳糖水解。而内含 IPTG 的培养基同时含有 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (x-gal)，x-gal 相当于乳糖，x-gal 被水解，菌落呈蓝色，否则无色。要使 x-gal 被水解，处于质粒上的 $lacZ$ 基因和缺少 $lacZ$ 基因的宿主大肠杆菌相互补。由于 $lacZ$ 基因处于乳糖操纵子的前 59 个密码子区段，一般叫做 α 序列，故称这种互补为 α -互补。无 α -互补，无 x-gal 水解，便无蓝色出现。②免疫学方法。用自制或现有的同位素

或其他方法标记的抗体和其他方法标记的抗体和目的基因表达产物进行免疫反应，因宿主的不同，非分泌型的宿主主要对其菌落进行溶解和固定（原位放射免疫反应），分泌型的可进一步对蛋白质进行电泳分离，然后在膜上固定（Western blot），固定后的表达产物然后进行免疫反应。如果直接在培养基上进行免疫反应（沉淀法），在菌落周围将产生白色沉淀物圆圈。③利用噬菌斑筛选。 λ 载体中重组的外源 DNA 达到 λ DNA 的 75% ~ 105% 长度时，进入宿主的重组后的载体会在培养平板上形成清晰的噬菌斑，所以噬菌斑的形成不仅要使重组后的 λ 载体进入宿主，而且要使重组后的 λ 载体能自动包装成有活性的噬菌体颗粒。

核酸杂交法 核酸杂交法的关键是获得有放射性或非放射性但有其他类似放射性的探针，探针的 DNA 或 RNA 顺序是已知的。让含重组体的菌落或噬菌斑由平板转移到膜上并释放出 DNA，变性并固定在膜上，再同 DNA 探针杂交的方法叫原位杂交。将重组体 DNA 用限制酶切割，分离出目的 DNA 后走电泳，再将原位转至薄膜上固定后用探针杂交的方法叫 Southern 杂交。Southern 杂交和 Northern 杂交类同。前者检测 DNA，后者检测 mRNA，两种方法实际上是一种分子水平的原位杂交。获得的 DNA 和 mRNA 可以进一步做序列分析。利用分子杂交原理，可以重组体中的目的 DNA 为探针，反过来在已有的总的 mRNA 中筛选出和已重组的 DNA 相对应的 mRNA，然后将由此挑选而来的 mRNA 在体外的无细胞翻译体系中进行翻译，经过对翻译产物的电泳和显影，搞清目的 DNA 和其编码的蛋白质之间的对应关系，这一方法叫做转译（翻译）筛选法。

在重组 DNA 筛选方法的知识中，出现了一批容易混淆的概念。这些概念在分子生物学中具有非常重要的意义，不仅在重组体筛选，而且在 DNA、RNA 和蛋白质分离及测序中经常遇到。通过理顺这些概念，可以将 DNA 重组，生物大分子分离和测序的原理真正搞清楚。①关于印迹技术的概念。印迹是将 DNA、RNA 或蛋白质固定在固体支持物的过程。通常使用的支持物为硝基纤维素膜或尼龙膜，有时也有 Whatman 541 滤纸等，印迹的目的是减少待测物质的流动性，防止丢失、扩散，保持原有的位置，便于反复使用，容易进行斑点和序列分析，简化分离手续。Southern 杂交、Northern 杂交和 Western 印迹三种方法实际上都是印迹技术，是以发明人名字命名的。Southern 杂交针对的是检测 DNA，Northern 杂交检测对象是 RNA。由于 DNA 是重组对象，mRNA 是重组 DNA 的转录产物，DNA 和 RNA 在检测前所处的位置不同，前者在重组体中或经限制酶切割后走电泳分离的，后者是转录产物，以游离态经电泳分离的，前者可不经限制酶切割和走电泳而直接在宿主所处的菌落中定位，后者必须经电泳分离后才可定位于薄膜上。Western 印迹针对的是翻译产物蛋白质，经电泳分离和定位在薄膜上之后不能进行核酸杂交，只能用免疫学方法进行检测，Southern 和 Northern 定位后的 DNA 和 RNA 可以用核酸杂交方法进行检测。②关于原位检测技术的

概念。“原位”一词有两种含意。一种是指菌落或噬菌斑原位。同含重组体的宿主细胞在培养基的原位影印到固体膜上后裂解释放出核酸或蛋白质。若检测对象为核酸时，用核酸杂交（Southern 杂交和 Northern 杂交）。若检测对象为蛋白质时用原位放射免疫反应或 Western 印迹法进行。“原位”一词的另一含义是在电泳凝胶平板上的原位，也可以转移到（影印）固体膜上。通过上述对比分析可以看出，印迹技术和原位检测技术实际上是密切相关的。原位检测是通过印迹技术实现的。通过印迹，实现了菌落原位和电泳带的原位，实现原位的目的在于从一大堆或一批多态的组分中进行专一挑选。

5.14 RNA 的生物合成

RNA 生物合成有两种方式，主要是转录，首先是以 DNA 为模板的 RNA 合成，其次是复制，即以 RNA 为模板合成 RNA。

DNA 的转录是 DNA 中的信息流向 RNA 的过程，是基因表达的第一步。转录是染色体 DNA 分子一部分表达成 RNA。和 DNA 复制和翻译相比，目前已知的转录的知识最多。转录研究的问题主要有：①RNA 聚合酶；②转录过程；③转录后加工；④转录的调控。前三个问题是基本内容，第四个问题是目前研究的焦点，转录调控是基因调控的核心。

(1) RNA 合成酶

RNA 合成酶的共同特点是：①以 NTP 为底物，以 DNA 为模板；②以 DNA 两条链中的一条链为模板，且在一条链内选择区段转录，不同的基因在两链之间选择；③RNA 合成的方向为 $5' \rightarrow 3'$ ，模板被使用的方向为 $3' \rightarrow 5'$ ，无需引物；④全保留式；⑤只有聚合作用，无核酸酶活力。

原核生物 RNA 合成酶特点是：大肠杆菌仅有一种 RNA 合成酶，5 个亚基 $\alpha_2\beta\beta\delta$ ， $\alpha_2\beta\beta$ 为核心酶， δ 因子识别启动子， β 亚基催化 $3'$ ， $5'$ -磷酸二酯键形成，另有 ω 亚基待究，已知四种亚基分别由 *ropA*、*ropB*、*ropC* 和 *ropD* 基因编码。

真核生物 RNA 合成酶特点：有三种（I、II、III）存在于核仁和核质，另一种存在于线粒体和叶绿体。真核生物 RNA 合成酶不受利福平抑制，但受 α -鹅膏蕈碱不同程度的抑制， α -鹅膏蕈碱与 RNA 合成酶 II 结合，放线菌素 D 与 RNA 合成酶 I 结合。

在描述真核生物 RNA 合成酶受 α -鹅膏蕈碱抑制时，常用“中度敏感”、“不敏感”、“高度敏感”来表达受抑制的程度，如果把各自产生抑制效果时所需的抑制用量同时考虑，很容易产生混淆。这种翻译而来的表达抑制剂与酶活性关系的术语使用起来比较别扭和很少见，要引起注意。“敏感”等于容易受到抑制，抑制剂用量也就少些。一旦真核生物 RNA 合成酶研究达到原核生物 RNA 合成酶

那样深入和具体，三种类型的划分可能要具体和简单一些了。

(2) 转录起点 (启动子)、转录单元、终止子、上游序列、下游序列

为了描述 DNA 转录的部位，常用这些概念来表达。首先要明确，这些概念是针对 DNA 而言的，是 DNA 分子中的序列结构，启动子是转录起点、 σ 因子的识别位，终止子是转录终止的部位，从一个基因的启动子到它的终止子之间的全部 DNA 序列叫做一个转录单元。启动子和终止子可由几个基因共享，而且有通用性。DNA 重组后的目的基因表达至今能够采用的启动子屈指可数就说明可通用这一点，一种 RNA 合成酶可以识别细胞内所有染色体中的基因的启动子更说明这一点。

启动子的序列确定之后，常把启动子前面 (5' 方向) 的序列叫做上游，后面 (3' 方向) 叫做下游，起点为 +1，下游为 +2，+3，……。上游依次为 -1，-2，……。

启动子序列特点这个问题是研究 DNA 转录中结构生物学和信息生物学特别关注的问题，究竟什么样的序列可以作为启动子，原核和真核有什么启动子方向的区别，各种基因和基因簇使用的启动子之间根本差别何在等很多这些方面的研究说明这一点。

Pribnow 区 这是 Pribnow 和其他人在 -10 序列附近发现的原核生物启动子，通常由 5 个核苷酸共同序列：T₈₉A₈₉T₅₀A₆₅A₁₀₀，右下角数字为出现频率。这一共同序列为 RNA 合成酶紧密结合位点，其特点是富含 A 和 T。

T₈₅T₈₃G₈₁A₆₁C₆₉A₅₂ 区 原核生物 -35 序列附近的另一个共同序列。这一序列不同于 Pribnow 序列之处在于内含有 G 和 C，其作用是与 RNA 合成酶识别启动子有关。-10 区和 -35 区的最佳距离为 $17 \pm 1\text{bp}$ 。

Hogness 区 真核生物 -25 ~ -35 区有一共同序列 TATAAAAG，又称 TATA 区，担负转录精确起始。

CCAATT 区 真核生物 -70 ~ -80 区所含的共同序列。

GC 区 真核生物 -80 ~ -110 所含，序列结构为 GCCACACCC 或 GGGCGGG，因多为 G 和 C，故称 GC 区。这是真核生物不同于原核生物启动子的特有的序列。

真核生物的 CCAATT 区和 GC 区主要控制转录起始频率，上述三种启动子区来自蛋白质基因 (RNA 合成酶 II 识别)。

真核生物的转录启动子可以在基因的内部。一个基因可以有两个以上的启动子。启动子还可以出现在基因序列之外相隔几十至几百个碱基对。三种真核 RNA 合成酶的启动子区不同。

在 DNA 重组技术中，目前常用的启动子主要是原核生物启动子，如 lac，Trp，tac， λp_1 等，如：

- 35

- 10

Tac TTGACA TATAA

Trp TTGACA AACTA

由于已知转录启动子序列是保守序列，人们已着手组建新的超自然的启动子，如 Tac 启动子是 Trp 与 Lac 启动子杂合而成的人工启动子，生物活性大于 Trp 和 Lac 启动子。

(3) 终止子

转录终止的研究比较困难，已知的研究结果很浮浅和零碎。由于合成的 RNA 不断被体内 RNA 酶水解，真核生物要在 3'端加 polyA 尾巴，现在主要靠体外转录来研究。

终止信号存在 RNA 合成酶已经转录过的序列之中，这种提供终止信号的序列叫做终止子。终止子可分为两类，一类依赖于蛋白辅因子 (ρ 因子)，一类不依赖蛋白辅因子。

终止子序列特点：普遍存在回文序列，依赖 ρ 因子的 G、C 含量少，不依赖 ρ 因子的 G、C 含量多。回文序列导致转录终止是由于发夹式 RNA 二级结构的形成。

ρ 因子和 RNA 合成酶的 β 亚基作用。

上述终止子知识来自原核生物。真核生物终止子了解更少。

CAP 位点 大肠杆菌乳糖代谢研究揭示了原核生物普遍存在的负调控，进而又发现正调控。乳糖启动子实际上可以进一步划分出两个位点，-70~-50 为位点 I，-50~-40 为位点 II，这两个位点之间有协同效应。当位点 I 被 cAMP-CAP 复合物结合时，位点 II 结合 cAMP-CAP 复合物能力大大提高，进而促进 RNA 聚合酶和 -35 及 -10 区结合，CAP 是 cAMP 的受体蛋白，大肠杆菌缺少葡萄糖时，cAMP 浓度增加。

(4) 增强子

增强子于 1980 年首先在 SV40 转录单元发现，它是转录起点上游约 200bp 处的两段 72bp 长的重复序列，虽不是启动子的一部分，但能促进转录。增强子存在的范围目前主要是真核生物基因，如免疫球蛋白、胰岛素、胰糜蛋白的基因，其次是病毒，如 SV40 和反转录病毒基因。

增强子可移植或嫁接到无增强子的基因中，从而提高转录水平。如 β -珠蛋白基因表达时外加增强子时转录水平可提高 200 倍。

增强子可以促进两个方向（相邻基因）的转录，且与其自身位置无关。

增强子的序列结构特征有待进一步研究。

增强子虽无基因专一性，但有组织和细胞特异性。

增强子见于 RNA 合成酶 II 识别的蛋白质基因调控区。

(5) 转录因子 (TF)

真核生物 RNA 合成酶不同于原核生物, 通常需要一些本质仍为蛋白的因子协助。这些转录因子分为两大类: 一类为普遍性转录因子 (简称转录因子), 结合于像启动子这样的常规或普遍性顺式元件; 另一类为转录调控因子, 结合于增强子这样的专一行使转录速率调控的顺式元件。前者关系到是否有转录出现, 类似于原核细胞中的 δ 因子, 后者关系到转录快慢。转录因子发挥作用无非靠自身的蛋白质所具有的结合能力, 要么和 DNA 相结合, 要么和蛋白质相结合。

了解较多的和 DNA 相结合的转录因子有以下几种转录因子: TFIID, 和 TATA 区结合; CTF, 和 CAAT 区结合; SP₁, 和 GC 区结合; HSF, 和热激蛋白启动子结合。

目前发现的普遍性转录因子的命名常以转录因子 (TF)、协助的 RNA 合成酶 (I、II、III) 和序列编号 (A、B、C……) 三部分组成。如 TFIC、TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIG、TFIIIA、TFIIIB、TFIIIC 等。转录调控因子的命名是由英文名称各单词首字母而来的, 如 HSF 为热激因子 (heat shock factor)。

(6) 转录产物加工

原核生物基因转录产物加工 原核生物基因中无内含子而以混合操纵子形式成簇存在。转录后加工的任务主要是切割分开, 其次是去除附加序列。tRNA 和 rRNA 还要经碱基修饰, tRNA 要添加 - CCAOH, 和真核生物不同, 无切割后的拼接。①30S 转录产物切割成 16S、23S 和 5S rRNA 及一个或多个 tRNA, 16S rRNA 及 23S RNA 还要甲基化修饰, 5S rRNA 无甲基化修饰。②tRNA 前体切割成单个 tRNA, 除去附加顺序和进行核苷修饰 (包括碱基和核苷) 及 3' 端加 - CCAOH。

真核生物基因转录产物加工 因真核生物基因转录初级产物和最后的活性产物一级结构相差较大, 研究发现了转录后加工。①加 5' 帽子结构和 3' poly A 尾。真核生物 mRNA 一般具有 5' 帽和 3' poly A 尾。5' 帽结构为 m⁷G^{5'}PPP^{5'}NP, 具有翻译识别和延缓降解的作用, 这是当 hnRNA 合成到长达 20~30 个核苷酸长度时被外加上去的。3' poly A 尾是长达 200 个左右的 A。5' 帽和 3' poly A 尾均无转录模板。②剪接。真核生物初级转录产物中含不编码的内含子转录序列, 除去这些序列并将其余编码部分接合在一起称为剪接。除了组蛋白和干扰素外, 其余真核生物蛋白质基因都含有内含子, 而且至今尚未发现单独的外显子存在。剪接的对象是核内不均 RNA (hnRNA) ——公认的真核生物基因初级转录产物。tRNA 前体和 rRNA 前体剪接的方式有三种: 第一种是自我剪接, 依靠转录初级产物特殊的一级结构进行自发地剪接, 体外实验无需外加酶或蛋白质, 这是由于它们的内含子是酶, 本质为 RNA 的酶, 或者它们的内含子编码是 RNA

剪接的酶，如四膜虫中 35S rRNA 的内含子就是一种本质为 RNA 的酶——核酶，而酵母线粒体细胞色素 b 基因 (Cob 基因) 中三个内含子编码有各自的 RNA 成熟酶，这类酶本质仍为蛋白质，但其作用主要是稳定 RNA 的空间构象。第二种是有蛋白质或酶参加的剪接，这些酶和蛋白质并非是被切除的内含子所编码，如 tRNA 前体的加 I；第三种剪接方式介于上述两种之间，剪接方式与第一种相似，依靠转录初级产物的特殊一级结构进行拼接，但需要外来因子协助，类似于第二种，不过外来的因子不是酶或蛋白质，而是核内小 RNA (snRNA) 和蛋白质形成的复合物 (snRNP)。核基因的 mRNA 是以这种方式剪接的。剪接的结果，由于内含子的去除，外显子之间的接合会出现多种方式：一种是 mRNA 前体剪接之后可以形成两种甚至多种 mRNA；一个基因有两个启动子区域，由于转录调控和后加工不同，也可以产生两种 mRNA；利用多个加 poly A 位点和不同的剪接方式也可产生不同的 mRNA。由此说明，同一基因可以产生组织和细胞专一性不同的蛋白质，也可以产生与发育不同阶段有关的不同蛋白质，剪接带来了基因作用放大和时空调节作用。③RNA 的编辑。布氏锥虫、簇生型短膜虫线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 II 基因转录产物 5' 端附近的 4 个 U 残基，布氏锥虫细胞色素 b 基因转录产物 5' 端的 2 个 U 残基以及在线虫、牛痘病毒等发现的非编码的 U，已被证实是转录后在多种酶的作用下额外加入到 mRNA 中去的，这一过程称为 RNA 的编辑。RNA 编辑方向为 3'→5'，编辑过程不仅加入 U，而且还有切除 U，RNA 的编辑对遗传信息究竟是什么提出了挑战。

(7) 转录的过程

详细的转录过程尚不明了，特别是真核生物基因转录。但转录的结果和部分条件早已为人们所利用，而且已经商品化。通常把转录划分为起始、延长和终止三个阶段，后加工可算作第四阶段，且与模板无关，所需的酶和其他条件，甚至在细胞中的部位都不同于前三个阶段。

起始 起始的过程就是 RNA 合成酶和启动子结合的过程，起始的完成是以第一个三磷酸核苷进入起始位点为标志的，具体包括辨认起始点—酶结合—启动子活化—模板双链解开—酶移向转录起点—第一个三磷酸核苷进入。

延长 延长的方向是 5'→3'，模板利用的方向是从 3'→5'，RNA 合成酶和模板 DNA 做相对运动，究竟哪一方为主尚不能肯定。双螺旋 DNA 的解螺旋和再螺旋都是由 RNA 合成酶来完成的。大肠杆菌转录的长度为 17 个核苷酸/秒。

终止 转录进行到终止子时停止，否则叫通读。

通过对基因转录的研究，人们发现了许多重要的事实：①DNA 双链可以三链方式短期存在，第三条链如果是 DNA，等于是复制态，如果是 RNA，等于是转录态；②DNA 双链呈互补，但携带的信息不同，遗传信息并非全存在一条

DNA 链之中；③RNA 有催化活性，打破了酶的本质都是蛋白质的认识；④一个基因多条肽链，由于转录加工，从一个基因可以产生多种蛋白质；⑤转录产物的核苷酸序列和原基因序列不一定完全相同。转录加工中内含子的去除、修饰、添加和编辑，使转录初级产品序列不同程度改变；⑥基因编码的内容有 tRNA、rRNA 和蛋白质，一个基因的活性可以通过其他基因表达产物来调控，也可以通过其他基因的序列直接调控；⑦对于一条 DNA 链说来，转录是不连续的，是有选择的。

5.15 转化、转染、转导、转基因

在原核生物 DNA 体外重组的过程中，重组后的目的基因进入受体细胞有转化、转染、转导三种方式，要注意区别这三个概念。

转染（transfection）是指将用作载体的病毒 DNA 和目的基因 DNA 重组后直接导入受体细胞。

转化（transduction）是指用携带有目的基因的病毒颗粒（既有重组 DNA 又有病毒外壳蛋白包裹的完整病毒）导入目的基因的方法。携带有目的基因的重组 DNA 获得的外壳蛋白是来自非重组的病毒。

转导（transformation）是用质粒导入目的基因的方法。

这三种方法中，转染和转化使用的是病毒载体。转化的效率比转染高出 1000 余倍。

转基因 真核生物的重组基因进入受体细胞比较困难，植物细胞有细胞壁，动植物细胞没有质粒，原核生物的基因表达系统不同于原核生物，导入目的基因的方法尚不成熟。除了利用病毒、酵母质粒导入外，常采用显微注射、核移植、细胞融合等方法。通常将这些方法统称为转基因技术。

5.16 PCR 技术

在目的基因扩增时，除了化学固相合成技术之外，应用最广泛的是 PCR 技术。

世界上第一个获得专利权的生物技术是 PCR（polymerase chain reaction）技术，1985 年由 Mullis 正式建立。Mullis 和 Michael 共同获得 1993 年诺贝尔化学奖。

PCR 技术的关键是前述的 KlenowDNA 聚合酶，此酶后被耐高温的 Taq 酶取代。

PCR 技术的步骤可概括为模板 DNA 高温变性成为单链 DNA→加入引物、

缓冲液、四种 dNTP→降温至 55℃，引物和模板结合→升温至 77℃ 左右进行复制→分离。

PCR 技术被广泛应用来自三个优势，一是 DNA 的复制合成在体外较高的不容易污染的温度下进行，需要的条件相当简单；二是被复制的 DNA 不是像体内那样直接需要双链 DNA，而是高温变性后获得的单链 DNA，三是复制的速度极快。

5.17 生物工程、基因工程、细胞与组织工程、生物制药

生物工程是生物技术的产业化。生物工程的理论基础是 DNA 双螺旋结构学说和细胞生物学，技术基础核心是发现限制性内切酶和连结酶之后建立的 DNA 重组和细胞克隆技术。按照生物工程的对象，生物工程划分为基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程。按照生物工程涉及的应用领域划分为农业、环境、医药卫生等。

基因工程直接从事基因的改造。基因工程的方法以 DNA 体外重组为核心技术，还包括其他一切可以实现基因和基因组改变的技术，如细胞融合、核移植、细胞核以外其他有遗传物质的细胞器移植、转基因技术等。动植物转基因技术和 DNA 体外重组是有区别的，转基因技术无需目的基因载体。

蛋白质和本质是蛋白质的酶工程类似。通过蛋白质改造、设计获得目的蛋白质。早期的酶工程是天然酶的扩大生产和分离提取，最终获得酶制剂。固定化酶仅仅是将液态自然酶加工成可重复使用的固态酶制剂，固定化细胞、固定化增殖细胞实际上是多酶固定化，使用过程中酶的含量可以随着细胞数目不断增加而增加。从而延长了酶的使用时间。固定化酶及细胞的方法主要有吸附、交联、包埋、共价结合、反应器分隔等。吸附、包埋、交联和共价结合需要有非酶的载体。

基因工程、蛋白质和酶工程及糖链工程是从分子水平改造生命体。

细胞、组织工程是通过细胞的体外培养、改造获得目的细胞或组织。相同类型的细胞通过无性繁殖——细胞克隆后可以得到组织。细胞的全能性——一个个体所有的细胞中的 DNA 是一样的细胞工程的基础，实现分化后的细胞再次恢复分化能力是细胞工程的关键。实现细胞再次分化主要靠改变细胞的生存条件，如改变营养条件、外部信号刺激，这实际上是代谢调节。基因表达调节是细胞一次代谢调节的基础。

细胞工程应当包括细胞膜或生物膜工程，实现细胞膜的改造和从头设计。细胞膜工程主要目的是对不同膜上彼此差异最大的受体和物质转运通道的改造和设

计。

细胞膜、细胞和组织工程是从不同于基因和蛋白质等分子水平的细胞水平的生物工程。

目前生物工程的应用领域集中在农牧林业新品种培育、生物制药、体细胞克隆及环境保护。

生物制药既是指利用生物技术的制药，也是指药物来源于生物体。现代生物制药主要是指蛋白质和核酸药物。生物制药起源于动植物体内药用成分的分离提取和抗生素发酵，在 DNA 重组技术、转基因技术、细胞离体培养和体细胞克隆推动下，才有了今天的现代生物制药。现代生物制药包括酶、反义核酸、抗体、疫苗、生长因子。早期的生物制药还包括抗生素、维生素、激素、核苷酸等。由于毒副作用，抗生素面临淘汰。现代生物制药主要采用基因工程、细胞工程和发酵工程技术。药物基因通过基因工程获得具有药物基因的工程菌和离体培养的动植物细胞或多细胞个体，通过发酵技术或多细胞个体自然生长繁殖实现扩大化生产。现代生物制药无残留、无毒副作用、无污染、有高度专一性。现代生物制药以防治艾滋病、肿瘤那样的顽疾为主要对象。

5.18 生物芯片

以生物大分子制成的芯片叫做生物芯片。目前出现的生物芯片有蛋白质和核酸芯片两类，蛋白质芯片用于生物计算机，核酸芯片用于核酸测序、基因诊断和基础研究，例如 DNA 芯片。

生物芯片制作的基础是首先从数据库中得知大量的生物大分子的一级序列结构。其次是生物大分子附着的载体材料，然后按照已知的生物大分子序列结构，在载体上直接按照已知的生物大分子序列合成并有序排列在载体上，或者将已经合成的生物大分子有序的喷涂在载体上。

DNA 芯片上的碱基序列和待测 DNA 的碱基序列通过碱基互补配对成为杂交体后，通过载体对杂交 DNA 碱基配对比例和具体位点的区别感受，以光、电形式记录下来。在此基础上，实现对未知序列 DNA 的测序和基因诊断。

DNA 芯片上附着的 DNA 仅仅是由不同的 DNA 片断组成矩阵，用 DNA 芯片测知的 DNA 序列和 DNA 芯片上的 DNA 片断长度相等，对于整体的 DNA 分子测序，DNA 芯片测序的全部结果必须再通过拼凑才可知完整的 DNA 分子序列。这一点和电泳技术测序是相同的。现有的 DNA 芯片测序能力还不及电泳技术。

第六章 糖 代 谢

在糖、脂、蛋白质和核酸四大代谢中，糖代谢是研究最早、代谢途径了解最详细的。比较而言，糖代谢内容一直比较稳定。但要清楚地知道，糖的生物化学是迄今生物化学与分子生物学再次受到关注的一个焦点。随着物理和化学结构分析技术的不断改进，测定糖的序列结构已经开始。过去认为糖不能携带信息的观点已过时。糖在生物体中的作用正在重新认识中，糖在受体结构、蛋白质运输和分泌中的作用已表明了这一点。

糖代谢的知识主要有以下几个方面：①糖类的水解、裂解；②糖的分解（酵解、三羧酸循环等）；③糖的合成（光合作用、异生等）；④衍生多糖；⑤糖在生物膜及其他方面的作用；⑥糖代谢中的关键酶。前三个方面的内容为基本内容，后三个方面正在不断发展中。

6.1 糖类的水解和裂解

淀粉、纤维素、糖原、各种糖胶、几丁质等的水解由不同的酶催化。对糖类水解酶的了解不仅与糖代谢有关，而且在制药、食品等工业领域很重要。

淀粉酶 已知有 α 淀粉酶、 β 淀粉酶、葡萄糖淀粉酶等多种。 α 淀粉酶广泛存在于生物体中，作用于 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键。因来自细菌的 α 淀粉酶最适 pH 范围较宽，最适温度高达 70°C ，故优先被工业上采用。 β 淀粉酶存在于植物和微生物中，作用于 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键， α 淀粉酶和 β 淀粉酶均不能作用 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键，所以其产物为葡萄糖、麦芽糖和糊精，并使麦芽糖分子由 α 型变为 β 型。

葡萄糖淀粉酶 主要来自霉菌，对 $\alpha(1\rightarrow4)$ 、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键均有作用，最终产物为 β 葡萄糖。

果胶酶 果胶酶由三种酶组成：果胶酯酶、聚半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶。其作用分别为脱甲酯基、水解半乳糖醛酸基键和使果胶中半乳糖醛酸之间糖苷键断裂（非水解）。果胶酶主要来自霉菌。

纤维素酶 纤维素酶来自细菌，已知由数种酶组成，催化纤维素 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键断裂。

6.2 糖的分解特点

糖的最终分解产物是 CO_2 、 H_2O 和能量。糖的分解过程中碳链断裂并非是逐个碳原子脱落，而是历经 $6\text{C} \xrightarrow{\text{裂合}} 2(3\text{C}) \xrightarrow[\text{CO}_2]{\text{脱酸}} 2(2\text{C}) \xrightarrow[\text{CO}_2]{\text{脱酸}} \text{CO}_2$ ，是一个化大为小再逐个脱去的过程。糖的分解在有氧和无氧下均可进行，但无氧分解不彻底，有氧情况下的分解是无氧分解的继续。糖的分解要首先活化，活化的方式有磷酸化和酰基化两种，无氧下分解以磷酸化方式活化，有氧下分解以酰基化为主。糖的有氧分解是以间接方式进行的，是一种循环，脱碳原子和脱氢是在一系列可逆的中间物上进行的。糖的分解的实质是脱羧、脱氢过程。糖的分解释能是逐步的，而且是和储能过程相偶联，偶联的效率是有限的。

6.3 糖的分解途径

已知糖的分解途径有：糖酵解，葡萄糖 \rightarrow 丙酮酸；三羧酸循环，丙酮酸 \rightarrow 乙酰 $\text{CoA} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ；磷酸戊糖途径，葡萄糖 $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。

基本了解糖的分解，要做到：①熟悉每一种途径的反应步骤，要能用结构式而不是汉字写出全部反应。仅用汉字表达意义不大，因为无法真正弄清活化、脱羧、脱氢及变位的位置和机理，不能真正理解这些反应。②要熟悉每一步反应所需的酶和辅因子，特别是关键酶、接受氢的辅酶或辅基，因为这些内容关系到调节和计算最终将生成的 ATP 数。在糖代谢中出现的各种中间物是生物化学、生理学中屡见不鲜、反复使用、不可缺少、必须熟悉的物质。否则，在后续的脂、蛋白质、核酸代谢中会仍然感到为难。③对于每一种途径，要从发现史（研究史）、步骤、生物学意义三个方面进行学习。反应机理主要涉及到各种辅酶和辅基的作用机理、酶的作用机理，这些内容是一个进一步的深入和提高。由于这些内容目前的研究水平限制了人们做到详细和全面地了解这些内容，所以多数也只是做到知道即可的地步。其中有些内容已经有了定论，必须彻底理解。例如顺乌酸酶对柠檬酸分子中新与旧碳原子的选择识别、3-磷酸甘油醛脱氢酶的作用机理等。

6.3.1 糖 酵 解

全过程由 10 步反应组成，分别由 10 种酶催化，均分布在细胞质中。10 种酶中有 4 种激酶：己糖激酶、磷酸果糖激酶、磷酸甘油酸激酶和丙酮酸激酶。激

酶是一个习惯名或俗名，如果不仔细分析这4种激酶催化的反应，很容易误认为在此所说的激酶催化的反应是相同或相似的。前两种激酶以ATP为辅酶，使底物的醇羟基磷酸化，后两种激酶则是将高能化合物的磷酸基转移给ADP或GDP后生成ATP或GTP，相当于前两种酶的逆反应，但实际上前两种酶的逆反应是由另外两种磷酸酯酶催化的。所以说，俗称的激酶是一个不严格的名称，在大多数情况下，激酶是指催化耗能的、使ATP或GTP磷酸基转移到底物上的反应的酶，其逆反应由磷酸酯酶催化。

催化葡萄糖磷酸化的激酶有己糖激酶和葡萄糖激酶两类，前者不仅催化葡萄糖，也催化D-果糖、D-甘露糖磷酸化，可被G-6-P反馈抑制，是一种别构酶。而葡萄糖激酶对D-葡萄糖有特异活性，不被G-6-P反馈抑制，是一个由胰岛素促使合成的诱导酶，在高浓度葡萄糖时对降低血糖起主要作用有关。关于己糖激酶、葡萄糖激酶为什么仅使葡萄糖的6位磷酸化，而不能使1位和其他位上的羟基首先磷酸化的问题尚无解释，可能与这些酶对同一底物上不同位置的羟基有选择作用有关。例如磷酸化酶就在1位上磷酸化。

G-6-P是一个有多种去向的中间产物。既可以经异构构成F-6-P后再磷酸化为F-1, 6-2P，也可以经磷酸戊糖途径进行转变，还可以经磷酸酯酶水解再成为葡萄糖或经G-1-P转变为糖原。

值得注意的是，多种单糖磷酸化形式与跨膜作用有关。如葡萄糖进入细胞之后磷酸化阻止了葡萄糖再次离开细胞，这样很容易联想到，血液中的血糖是非磷酸化形式的葡萄糖。

催化 $F-6-P \rightarrow F-1, 6-2P$ 反应的磷酸果糖激酶是糖酵解中最关键的限速酶，是有亚基的别构酶。ATP、柠檬酸是该酶的抑制剂，要特别注意，ATP是该酶的抑制剂，也是该酶的底物，毫摩尔浓度（mmol/L）（生理浓度范围）ATP可完全抑制其活力。此酶的生理浓度远远小于其表观 K_m 值，仅用AMP、ADP、F-1, 6-2P这样一些激活剂的作用无法解释此酶为什么在体内仍有较高活性。1980年新发现F-2, 6-BP（2, 6-二磷酸 β -D果糖）是该酶的一个新的激活剂，其激活能力远大于已知的各种激活剂。它能够通过增加肝内6-磷酸果糖与酶的亲合力而消除ATP对此酶的抑制，此物质由前后酶或双功能酶催化生成，第一个酶催化6-磷酸果糖形成2, 6-二磷酸果糖，后者在第二个酶催化下水解成6-磷酸果糖。前一种酶是磷酸果糖激酶2，后一种酶是果糖二磷酸酶2，两个酶的差别仅仅是由于一个丝氨酸残基磷酸化（前者）和脱磷酸化（后者），所以是同一种蛋白质。肝脏中的此酶由两个相同亚基组成，每个亚基470残基，每个亚基上有一个受依赖cAMP蛋白激酶催化的磷酸化位点，鼠肝中此酶的磷酸化位点为N端32位Ser。

2, 6-二磷酸 β -D果糖不仅是磷酸果糖激酶的最强激活剂，同时也是1, 6-

二磷酸果糖酯酶的抑制剂，因此，对这种双功能酶两种活性的调节影响到糖代谢是朝酵解方向还是朝糖异生方向进行。著名的巴斯德效应，即在厌氧条件下有机体糖酵解速度加快，其作用点就在 6-磷酸果糖激酶。此酶受各种腺苷酸（ATP、ADP、AMP）浓度变化调节，厌氧条件下，ATP 浓度下降，ADP 和 AMP 浓度相应增加。这实际上就是一种需能状态，能荷的概念正好说明了这一点。

醛缩酶是糖酵解过程将活化的六碳糖裂解为两分子三碳糖及其逆反应的酶，这个反应的 $\Delta G'$ 为 $+24\text{kJ/mol}$ ，说明逆向反应比正向反应容易进行，此酶的俗名正好是从逆反应而来，这个反应相当于有机化学中的醇（酮）醛缩合，经历一个西夫碱的中间体过程。关于生物化学中的 $\Delta G'$ 为正的反应为什么能在体内进行，目前的解释是生物体内平衡过程不同于试管反应，生物体中一个化学反应产物同时又是下一个反应的底物，从而驱动 $\Delta G'$ 为正的反应朝向理论不允许的方向进行。醛缩酶是一类酶，有多种类型存在。醛缩酶在光合作用三碳循环中催化的是一个与酵解相同的逆反应。

糖酵解中除了四种激酶和一种裂合酶外，另有三个异构酶，分别催化 $G-6-P \rightarrow F-6-P$ 和两种三碳糖互变和磷酸甘油酸变位，均属同分异构。磷酸丙糖同分异构酶的超二级结构属 $\beta\alpha\beta$ 型， β 结构部分在内，螺旋区在外， β 和 α 螺旋交替存在，集中在中心的 β 折叠片形成 β -圆桶。丙酮酸激酶的第一结构域和磷酸丙糖异构酶结构域类似。

糖酵解中惟一的催化脱氢的酶是 3-磷酸甘油醛脱氢酶，此酶是糖酵解中研究得最为详细的酶，各种水平的结构数据已知，在研究蛋白质变性机理和动力学中广泛使用。此酶的辅酶为 NAD，碘乙酸因与其活性残基的-SH 作用而强烈抑制此酶，砷酸和磷酸竞争结合此酶，由此解释了砷霜中毒的机理。证实了砷酸盐是解偶剂。

6.3.2 三羧酸循环

在有氧情况下，酵解产物丙酮酸进一步分解，三羧酸循环是糖彻底分解的主要途径。

丙酮酸氧化脱羧酶系 生物体中有至少 4 个多酶体系，即丙酮酸氧化脱羧酶系、 α -酮戊二酸氧化脱羧酶系、脂肪酸合成酶系、S 短杆菌肽合成酶系。催化相关反应的多种酶及辅因子在空间上形成一个复合体，使底物依次通过这个复合体中各个酶后变成产物，从而提高了催化效率。丙酮酸氧化脱羧酶系是其中最具有代表性的一个多酶复合体。大肠杆菌中这种复合体由 60 多条肽链组成，包括 3 种酶和 6 种辅因子。二氢硫辛酸乙酰转移酶位于中间，用其能够转动的硫辛酸长臂把底物从一个催化位点转向另一个位点，这一结构和作用特点在其他多酶体系

中几乎是相同的。多酶复合体一般结合在膜上。丙酮酸氧化脱羧酶系作用机理的核心是维生素 B₁ 辅酶 TPP 的作用。TPP 的噻唑环中氮原子和硫原子中间相夹的碳原子很容易形成负碳离子，因而可亲核攻击丙酮酸的羧基碳原子。二者作用后在 TPP 噻唑环上氮原子接受电子时，使丙酮酸和 TPP 形成的中间物脱羧，从而获取带有羧乙基的 TPP。羧乙基 TPP 不稳定，在二氢硫辛酸的乙酰转移酶的作用下脱氢，其余的反应为乙酰基转移和辅因子复原过程。TPP 噻唑基的作用类似于组氨酸的咪唑基，既可是电子受体，又可是电子供体，均与环中氮原子有未共用的电子对有关。催化氧化还原反应的酶中，辅酶或辅基都有自身可逆氧化还原的能力，本身最终实际上起了电子或质子的传递作用。此作用机理在 α -酮戊二酸脱氢酶系、磷酸戊糖途径、二碳基转移酶中都存在。顺乌头酸酶的专一性不仅反映在对构型、构象、化学键、基团间选择，而且可以对分子中的原子进行新与旧的区别。柠檬酸中的 6 个碳原子若以中间两个碳原子为轴，上下各两个碳原子的结构是相同的，均为 $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ，所以是一个分子内有对称性的分子。顺乌头酸酶对柠檬酸的上下各两个碳原子应当平等对待，可是用同位素 ^{14}C 、 ^{13}C 分别标记乙酰 CoA 的甲基和羧基碳后，经柠檬酸 \rightarrow α -酮戊二酸反应第一次脱羧后的 CO_2 并无 $^{14}\text{CO}_2$ ，说明酶对柠檬酸分子中上下两个碳原子有选择。第一次脱羧只作用于原有的非标记的（不是直接来自乙酰 CoA）两个碳原子，说明了顺乌头酸酶有一种特殊的选择能力。人们利用三点附着学说来解释乌头酸酶的作用，顺乌头酸第一次作用的三位点中不包括新加入的两个碳原子，由这一发现人们得知了柠檬酸脱羧的不对称性。柠檬酸被认为是一种潜手性分子。

三羧酸循环中的脱氢酶 有氧分解在三羧酸循环中共有四个（类）脱氢酶：异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶。加上丙酮酸脱氢酶系，从丙酮酸开始的彻底分解历经五次脱氢。酵解中脱氢一次，一分子葡萄糖彻底分解有 6 次脱氢，正好脱去 12 个氢原子 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)，除了琥珀酸脱氢酶以 FAD 为辅基外，其余均为 NAD 或 NADP。因此通过脱氢可获得的 ATP 数为 $2 \times (3 \times 6 - 1) = 34$ ，即 6 次脱氢，每次相当 3ATP，减去因 FADH_2 比 NADH_2 少生成 1 个 ATP，重复两次（一分子葡萄糖生成二分子三碳糖）。酵解过程和三羧酸循环共有 3 次底物水平磷酸化，相当于有 $2 \times 3 = 6\text{ATP}$ 生成，两次磷酸化消耗 2ATP，所以从葡萄糖开始的彻底分解产生的 ATP 数为：

6 次脱氢	$2 (3 \times 6 - 1) = 34$
3 次底物水平磷酸化	$2 \times 3 = 6$
2 次磷酸化消耗	-2
净生成	$34 + 6 - 2 = 38$

和糖酵解相比，三羧酸循环也有水化（或脱水）、底物水平磷酸化和缩合反应，但从丙酮酸开始的分解有 3 次脱羧，重复两次后，相当于 6 个碳原子转变为

CO₂，这是三羧酸循环中伴随着脱氢进行的脱羧，是不同于糖酵解的关键之处。

6.3.3 磷酸戊糖途径

在胞液中的另外一个糖分解途径是磷酸戊糖途径。此途径解释了五碳糖和 NADPH₂ 还原力的来源，解释了在酵解和三羧酸循环受阻后为什么仍有 CO₂ 和能量形成和转化。此途径和光合作用的暗反应有相似之处，是 6-磷酸葡萄糖转化的支路之一。

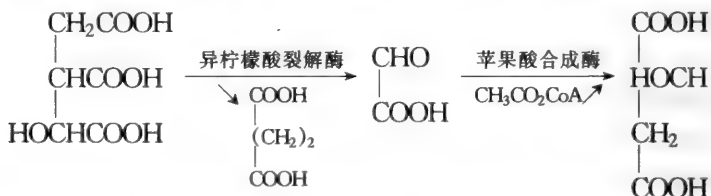
此途径的理解首先要熟悉常见的三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖的结构和差异，其次是要了解二碳、三碳转移酶的作用。此途径的反应概括起来仅有氧化脱羧和磷酸戊糖重排两种类型。

6-磷酸葡萄糖脱氢脱羧是此途径惟一的分解反应。催化反应的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的辅酶为 NADP 而非 NAD，此酶为调控酶。

二碳、三碳转移结果形成了三碳糖、四碳糖和七碳糖，二碳转移了两次，三碳转移了一次，即“二三二”转移过程。催化二碳转移反应的酶以 TPP 为辅酶，作用机理和丙酮酸脱氢酶中 TPP 类似；催化三碳单位转移的酶也需辅酶，经西夫碱中间过程完成，类似于酵解过程中的醛缩酶作用机理。以 TPP 为辅酶经历负碳离子进攻和经西夫碱中间过程的两种机理是糖代谢中普遍存在的酶作用机理。

6.3.4 乙醛酸循环

乙醛酸循环仅存在于植物和微生物中。和三羧循环相比，从异柠檬酸到苹果酸之间另有柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶分别催化的两个反应。



乙醛酸循环一周，相当于两分子乙酰 CoA 转变成一分子琥珀酸。由此解释了植物和微生物用乙酸或乙酰 CoA 维持生长以及种子发芽时脂肪如何转化为糖的问题。

6.4 糖的合成代谢特点

最根本的糖合成是光合作用，自然界一切有机物最基本的来源是光合作用，糖异生、糖原和淀粉的合成是次级合成。

光合作用提供了 ATP 和 NADPH_2 ， CO_2 合成葡萄糖与磷酸戊糖途径和糖异生相类似。

6.4.1 三碳循环（卡尔文循环）

三碳循环从 1, 5-二磷酸核酮糖开始，历经 15 步反应再回到 1, 5-二磷酸核酮糖，其间有一分子葡萄糖生成。概括起来，这 15 步反应可划分为： $5\text{C} + 1\text{C} \rightarrow 6\text{C} \rightarrow 2(3\text{C})$ ，所以，三碳循环的关键是第一步反应。

1, 5-二磷酸核酮羧化酶-氧合酶（rubisco）催化三碳循环第一步反应。此酶含量占叶绿体蛋白质的 60%，有可能是自然界最丰富的一种蛋白质。已知有大、小亚基各 8 个。大亚基由叶绿体基因组编码，小亚基由核基因编码，某些红藻中此酶小亚基仍由叶绿体基因编码。此酶是别构酶，不仅有催化羧化的能力，还有催化 O_2 与二磷酸核酮糖反应的能力，而且同在一个活性位。加氧生成的磷酸乙醇酸可转化为甘氨酸或在乙醛酸途径中放出 CO_2 ，这就是光呼吸，是一个浪费能量的过程。使 rubisco 仅具有固定 CO_2 的能力而无结合氧的能力，成为基因工程的目的之一。

6.4.2 四碳途径

四碳途径见于起源于热带或亚热带的植物的叶肉细胞，其维管束鞘细胞仍以三碳循环为主。四碳途径并非是一种独立的循环，仅仅是一种对三碳循环的补充。此途径的 CO_2 受体为磷酸烯醇式丙酮酸，接受 CO_2 后生成草酰乙酸，再经还原生成苹果酸，苹果酸由叶肉细胞进入维管束鞘细胞后脱氢脱羧，生成的 CO_2 被三碳循环利用，生成的丙酮酸又返回叶肉细胞，经磷酸化重新转变成磷酸烯醇式丙酮酸。因此，四碳途径实际上起了运输 CO_2 由叶肉到维管束鞘的作用。

6.4.3 糖原的合成

糖原合成的起始物是 UDPG（尿嘧啶二核苷酸葡萄糖），需要引发蛋白和 4 个糖残基以上的引物。糖原合成酶催化 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键形成。分枝酶催化 $\alpha(1$

→6) 糖苷键形成, 此酶将 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键转变为 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键。

结构多糖生物合成时所需的各种衍生糖在形成多糖前要活化。活化方式有 3 种, 一种 GDP 化, 两种 UDP 化。由此可以看出, 单糖、衍生单糖在形成多糖时, 均以二核苷酸方式活化为主, 但在分解时, 以单磷酸化为主。

第七章 脂类代谢

在糖、脂和蛋白质三种能源物质中，脂类有多种特点：①脂肪是热值最大的一种，是糖和蛋白质的 2.3 倍；②脂肪是非极性分子，占用体积小，有利于贮存能量；③磷脂是生物膜的主要成分；④脂类生物合成的起始物质均为乙酰 CoA；⑤类脂及其衍生物有重要生理作用和经济价值，如类固醇激素、脂溶性维生素、磷酸肌醇、前列腺素以及橡胶等。

脂类代谢的主要内容有：①脂类的消化、吸收、转运；②脂肪的分解与合成；③磷脂的分解与合成；④胆固醇的代谢。

脂肪、磷脂的主要组分是脂肪酸，脂肪、磷脂和胆固醇生物合成的起始物都是乙酰 CoA，脂类代谢主要是脂肪酸的代谢，而脂肪酸分解的中间产物是乙酰 CoA，进一步分解经三羧酸循环。因此，脂类代谢主要是脂肪酸与乙酰 CoA 之间的代谢。

7.1 脂类的消化吸收与转运

脂类消化的最终产物是多种形式的，有甘油、甘油一酯、甘油二酯、脂肪酸、胆固醇，所以水解过程并非要求彻底，这几种形式都可被吸收。

甘油三酯水解酶 有脂肪酶、甘油二酯脂肪酶、单脂酰甘油酯脂肪酶三种。分别从两侧和中间催化酯键断裂。

磷脂的水解 有 A_1 、 A_2 、C 和 D 四类，其中 A_2 广泛存在于各种动物分泌的毒汁中，也以酶原形式存在于动物的胰脏内。脱去一个脂肪酸的磷脂叫溶血磷脂。 A_1 和 A_2 能分别水解磷脂中的两个脂肪酸，其产物均属溶血磷脂。C 水解磷脂中的磷酸酯键，使磷酸胆碱脱去。

脂类水解产物的吸收 脂类的降解产物进入肠粘膜细胞内，再形成脂类排入细胞间隙，再经淋巴系统进入血液。所以，脂类的水解和吸收经历了一个循环过程：

脂类 $\xrightarrow[\text{(肠内)}]{\text{水解}}$ 水解产物 $\xrightarrow[\text{(肠粘膜细胞内)}]{\text{合成}}$ 脂类 (载脂蛋白协助) \rightarrow 细胞间隙 \rightarrow 淋巴系统 \rightarrow 血液

脂类的转运 是指脂类在血液中转移至靶细胞和组织及由肠粘膜细胞内到细胞间隙，以脂蛋白形式转运。脂蛋白由载脂蛋白和脂类组成。载脂蛋白已知有 10 余种。形成的脂蛋白有 6 种：乳糜微粒、乳糜微粒残余物、极低密度脂蛋白、

中间密度脂蛋白、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白。前两种携带膳食中的甘油三酯，第三种携带内源甘油三酯，第四、五种携带内源胆固醇酯，最后一种携带内源胆固醇磷脂。6种脂蛋白的密度从前到后依次递增，颗粒逐渐变小，载脂蛋白比例总体逐渐增大。如果血液中脂蛋白合成异常，可出现低血脂和高血脂症。血脂是血浆中脂类的总称。

7.2 脂肪酸的分解

脂肪酸的分解过程有以下特点：①脂肪酸活化采用酰基化方式——脂酰 CoA；②脂肪酸分解过程中的碳原子脱去首先采取每次两个碳原子的方式，其产物为乙酰 CoA [糖代谢采取 $6C \rightarrow 2(3C)$ 的方式]；③脂肪酸氧化、裂解均在 β 位进行；④脂肪酸氧化的氢受体有 FAD、NAD 两种。上述特点是针对 β -氧化而言的。

脂肪酸氧化的实验证实采用苯环做标记。这是因为人和多数动物不能合成苯环，也不能打开苯环。这一方法是同位素标记技术的前驱。

脂肪酸由细胞质进入线粒体借助肉毒碱 (α , β -羟- γ -三甲氨基丁酸)。10C 以下的脂肪酸可直接进入线粒体。

脂肪酸在细胞质中活化后生成脂酰 CoA，此反应使 ATP 转变为 AMP，相当于消耗了 2 分子 ATP。

奇数碳原子脂肪酸 β 氧化之后有丙酰 CoA 生成。丙酰 CoA 转变成琥珀酰 CoA 或乙酰 CoA 后进入三羧酸循环。

不饱和脂肪酸氧化另需要 Δ^3 顺 Δ^2 反脂烯酰 CoA 异构酶和 β -羟脂酰异构酶，分别催化 Δ^3 顺 $\rightarrow \Delta^2$ 反应和 D 型 \rightarrow L 型反应。

α -氧化每次从羧基端通过脱羧失去一个碳原子。植烷酸经此途径转变成降植烷酸。

ω 氧化是 12C 以下的脂肪酸中出现的末端碳原子 (ω 碳原子) 羟基化后再氧化成羧基的代谢途径。此途径是油浸土壤中细菌将烃转变为脂肪酸的途径。

乙酰 CoA 的去路 脂肪酸氧化产生的乙酰 CoA 可直接进入三羧酸循环而彻底分解。也可①缩合成酮体 (乙酰乙酸、 β -羟基丁酸、丙酮)，酮体可引起代谢性酸中毒；②缩合成胆固醇、脂肪酸等；③合成氨基酸。

7.3 脂肪酸的合成

脂肪酸生物合成有以下特点：①脂肪酸生物合成的起始物为乙酰 CoA；②短链脂肪酸在细胞质中进行，进一步延长在线粒体和内质网中进行；③脂肪酸从头

合成以乙酰 CoA 为引物，每次加入三个碳原子（丙二酸），脱去一分子 CO_2 ，实际加入两个碳原子；④脂肪酸合成的延长途径在线粒体中每次加入两个碳原子（乙酰 CoA），在内质网中和从头合成过程相同；⑤脂肪酸生物合成从头合成途径在多酶复合体上进行，ACP 是该复合体的转动臂，类似于丙酮酸和 α -酮戊二酸氧化脱羧酶系中的八碳长链的中心酶；⑥碳链缩合之后的还原所需的氢来自 NADPH_2 ；⑦人和哺乳动物缺乏在脂肪酸第 9 碳原子以上位置引入不饱和双键的去饱和酶，所以不能自身合成亚油酸和亚麻酸（ $\Delta^{9,12}\text{C}_{18:2}$ ， $\Delta_{9,12,15}\text{C}_{18:3}$ ）和花生四烯酸（ $\Delta_{5,8,11,14}\text{C}_{20:4}$ ）。

脂肪酸合成多酶复合体 大肠杆菌中此复合体由 7 组分组成。中心为酰基载体蛋白（ACP），77 个残基，其丝氨酸残基与 α -磷酸泛酰巯基乙胺相连。另外 6 种为酶。真核生物中此酶系与大肠杆菌不同。如在酵母中，此复合体由 α 、 β 两亚基组成。 α 亚基有 ACP 缩合酶、 β -酮脂酰还原酶活性；而 β 链具有脂酰转移酶、丙二酸单酰转移酶、 β -羟脂酰脱水酶和 β 烯脂酰还原酶活性。哺乳动物中此酶系由相同二亚基组成，每个亚基中肽链形成三个结构域，每个结构域相当于一个反应单元。结构域 I 有乙酰转移酶、丙二酸单酰转移酶和缩合酶；结构域 II 含有载体蛋白、 β -酮脂酰还原酶、脱水酶、烯脂酰还原酶；结构域 III 含硫酯酶。三个结构域等于分别是缩合、还原和释放单元。

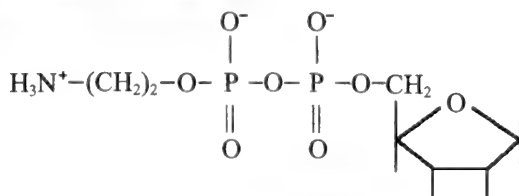
7.4 甘油三酯和磷脂的合成

甘油三酯由甘油和脂肪酸缩合而成，磷脂是甘油二酯和磷酸胆碱等的缩合产物。合成关键是活化双方的哪一方，如甘油三酯的合成，关键在于是活化甘油还是活化脂肪酸。然后是如何活化或采用什么方式，一般只需活化一方。

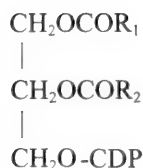
甘油三酯合成 植物、动物中双方都活化：甘油 $\rightarrow \alpha$ -磷酸甘油，脂肪酸 \rightarrow 脂酰 CoA。微生物中：甘油 $\rightarrow \alpha$ -磷酸甘油，脂肪酸 \rightarrow 酰基 ACP。

磷脂的合成 只活化一方。动植物中：活化甘油。微生物中：活化磷脂酸。

活化的方式均为胞嘧啶核苷酸。如：



CDP-乙醇胺



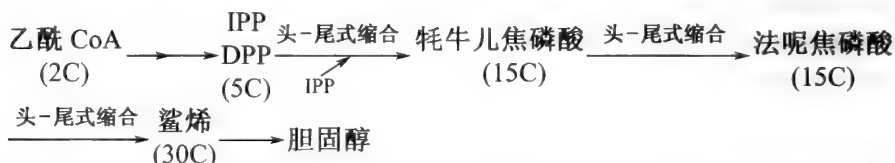
CDP-甘油二酯

鞘脂的合成 鞘氨醇代替磷脂中的甘油。鞘氨醇合成活化的一方为软脂酸，活化形式为酰基化（软脂酰 CoA）；另一方为另一分子脂肪酸，活化方式同软脂酸。鞘脂合成活化的一方为胆碱，活化形式为 CDP-胆碱。

7.5 胆固醇的代谢

胆固醇以转变为非开环的各种衍生物的方式被进一步利用，并非彻底分解。

胆固醇生物合成过程是各种异戊二烯类化合物合成的代表。此途径可概括为：



胆固醇是 6 分子异戊二烯聚合体，由异戊二烯开始，可合成脂溶性维生素、麝香、橡胶、松节油、质体醌、蜕皮素等萜类化合物。这些物质的碳原子数一般是 5 的倍数。

胆固醇的衍生物有性激素、胆酸、维生素 D、肾上腺皮质激素等。要注意区分二类性激素和肾上腺皮质激素，三者结构上的主要差别在于：①雌二醇、雌三醇的 A 环为芳香环且带有羟基；②雄激素 A 环为非芳香环；③皮质激素都有二碳 R 基；④黄体酮的结构不同于雌二醇，A 环为非芳香环，且有二碳 R 基。掌握这些特点，可以区分三类类固醇激素。

前列腺素、凝血噁烷酸和白三烯的合成共同前体是花生四烯酸。

第八章 生物膜与生物氧化

8.1 生物膜

生物膜由磷脂、蛋白质和糖复合物组成。1972年,提出液态镶嵌模型。近年来,又提出“板块镶嵌”模型,认为膜是具有不同流动性的微区相间隔的动态结构。

生物膜是生物分子组装体,是超分子结构。

生物膜中有受体蛋白、离子泵、离子通道、电子传递载体。生物膜担负细胞识别、细胞粘着、信息传递、信息放大、电子传递和能量转换等功能。

离子泵的实质主要是酶,是蛋白质。无论何种泵,目前是指生物膜中具有逆浓度差、耗能、定向运输能力的物质和微区结构。了解最多的有 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵、 Ca 泵、 H^+ 泵等,泵的作用是使离子逆浓度梯度定向运送。泵的作用需要 ATP 和其他方式的能量供给。目前认为泵作用的过程实际上是组成泵的蛋白质因磷酸化-去磷酸化的耗能作用而发生构象改变,使携带某种离子的侧面转向另一侧,从而实现了运输,这相当于泵的组成在膜内转动或翻转,形象的说,是一种分子马达。

离子通道 生物膜中的蛋白质在膜内形成一个通道,或一个孔洞,其口径大小可控,控制的方式一是靠膜电位,二是靠膜上配体如激素、神经递质的结合。

离子载体 从微生物中获得的一些抗菌素,如缬氨霉素、尼尔利亚菌素、短杆菌肽等可在膜中移动从而携带离子进出,同时伴随有离子交换。

离子泵、离子通道、离子载体都是用来解释离子进生物膜的。大分子物质的跨膜运送用细胞的外排、内吞、信号肽和导肽来解释。

细胞识别用受体理论来解释,在激素作用机理中已讨论。

8.2 生物氧化

生物氧化研究生物体中水的生成,即脱下来的氢如何同吸入氧结合成水并合成 ATP。

8.2.1 生物氧化的物理化学基础

氧化-还原电势 氧化的三种方式——脱氢、加氧和失电子归根结底是失电子。能供电子的物质叫还原剂，能获得电子的物质叫氧化剂。和标准电极——标准氢电极做对照，使各种物质的得失电子能力有了一个比较——标准电动势。比标准氢电极的电动势（规定为零）小时，该物质的标准电动势为负值，表明该物质易失电子；相反则表明该物质易得电子。

利用氧化-还原电势求自由能 公式为： $-\Delta G^\circ = n\Delta E^\circ F$ ，其中 F 为法拉第常数，等于 96485 C/mol ， n 为氧化-还原反应中传递的电子数。

利用氧化-还原电势求平衡常数 公式为：

$$\Delta E^\circ = 2.3 \frac{RT}{nF} \lg K_{\text{eq}} \quad (\text{反应物和产物均为 1 摩尔})$$

$$E_n = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{氧化态}]^a}{[\text{还原态}]^b}$$

氧化-还原电势从理论上为生物氧化中电子在生物膜上的传递方向判定和 ATP 生成能量转化机理提供了一个途径。但实际的情况仍需用实验来证实，已知的事实表明生物氧化机理甚为复杂，至今仍是生物化学中的一个难题。

8.2.2 线粒体的结构——生物氧化的细胞学基础

线粒体是生物氧化的场所，叶绿体是线粒体反向作用场所，初步认为二者作用的机理是类似的。叶绿体的光收集作用与生物氧化相对独立，但能量转化的原理仍有共同之处。

线粒体有双层膜。内膜内褶成嵴，由此增加了内膜面积。内膜中有与生物氧化相关的各种酶和因子。呼吸进行时，内膜分隔的基质有体积和结构的变化。大量实验证实，氧化磷酸化是在内膜进行的，对于原核生物说来是在质膜上进行的。

8.2.3 氧化磷酸化要点

呼吸链是电子传递链。

呼吸链的组分是分别研究得出的，NAD 呼吸链比 FAD 呼吸链多形成一分子 ATP。

呼吸链中的各组分的排序有待进一步研究，目前的排序来自多种方法。①各

组分的氧化-还原电势，此值越负，越朝前排列；②分离重组；③分光光度法测定完整呼吸链各组分的氧化-还原态。

一对电子经呼吸链传递至氧可生成的 ATP 数来自：①根据相邻的组分氧化-还原电势差，折算求得 $\Delta G'$ ，接近一分子 $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ 释放能量者相当于有一个偶联位。②P/O 比值法。一对电子在呼吸链中传递至氧可生成的 ATP 数等于所需的无机磷原子数。但无论有多少 ATP 生成或消耗多少无机磷原子，需氧的原子数总是等于 1。③专一性抑制剂法。用电子传递抑制剂可以定点抑制电子在呼吸链中传递，进而判定电子传递的顺序。用解偶剂可以使氧化磷酸化偶联定点解除，由此可知偶联位和数目。

以 NAD 为辅酶的脱氢酶不等于是 NAD 脱氢酶，前者催化底物脱氢，NAD 被还原，后者催化 NADH_2 氧化。其他辅基、辅酶类似问题同理，二者不可混淆。

细胞色素 aa_3 是细胞色素中可将电子传递给氧的组分，所以又叫细胞色素氧化酶，此酶在结构上含血红素 A 和两个铜原子，明显不同于其他细胞色素。

一些常见的电子传递抑制剂、解偶剂很重要，不仅有助于生物氧化的深入理解，而且在中毒与解毒、药物作用机理、生物大分子相互作用、基因表达调控等方面要经常应用这些知识。

氧化磷酸化解释 ATP 如何生成的问题，已知有底物水平和电子传递式两种。电子传递式又分为线粒体电子传递和叶绿体光合磷酸化两种，前者通过底物脱氢后获得可传递电子，后者在光的推动下从水中获得可传递电子。

电子传递式氧化磷酸化的作用机理中最主要的理论是化学渗透学说。此学说的要点是：①递氢体和递电子体在膜上相间排列。②递氢体有 H^+ 泵作用，可将 H^+ 通过半透膜泵入内膜和外膜之间的间隙中。因内膜不能自由通过 H^+ ，由此导致电位差的形成。这是 ATP 生成的动力。③当 H^+ 沿内膜专一通道再次向内侧穿入时，其电位差推动 ADP 转变为 ATP，机理待究。

线粒体内膜的电位差是外正内负，叶绿体内膜是外负内正，二者相反。

第九章 代谢调节

9.1 代谢调节的方式和水平

代谢调节的水平有三种，第一是细胞水平，第二是激素水平，第三是神经水平。细胞水平的调节主要是酶的调节（酶量、酶活性、区域化）。激素的调节在细胞之间进行，调节同一反应有正向和负向两种方式，前者使代谢加强，后者使代谢削弱。激素调节有激素的量、激素之间的比例、激素和受体之间有效作用、激素的传输等调节环节。神经调节以整体协调为特点，通过激素、酶或直接对器官和组织的代谢进行调节。

酶、激素和神经递质及其他调节因素相比较，所有的调节方式都是由酶来实现。激素、神经调节通过不同的细胞、不同器官和组织的多种相关酶一起进行调节。而酶的含量、寿命、活性大小与基因调节密切相关。基因调节可使某种酶从无到有，也可以从有到无，所以基因调节是最根本的调节。只有彻底、系统地了解基因调节的机理，才能对代谢调节有根本的认识。生命活动的根本特点是自我调节。

9.2 酶水平的调节

酶的调节作用通过酶量、酶活性、区域化三种方式进行。由于基因表达调控认识水平有限，酶量的调节了解得不多。原核生物酶的诱导与阻遏的认识比起真核生物要深刻的多。真核生物细胞的区域化使酶的分布受生物膜系统的分隔，从而把代谢调节和膜的作用联系起来。目前酶的调节作用以酶活性的调节了解得最多。

9.2.1 酶量的调节

一种酶的量最少到含量几乎为零，最多到使其催化的反应速度达到最大的所需酶量。如果某一细胞或生物体中原有某种酶随后逐渐消失了，一般而言是因为这种酶的基因表达停止了。如果某一细胞或生物体中某一时期新出现了某种酶，这是因为该酶的基因由关闭状态转向打开。如果某种酶的基因一直在表达，而这种酶的量却逐渐下降，可能是这种酶的降解加速了，或者这种酶所需的辅因子缺

少而使这种酶的组装无法彻底完成或酶原转化为酶的过程受阻。在这几种情形中，以与基因表达的调节有关的酶量调控研究得最多。当然基因表达的产物不仅仅是酶，还有其他的蛋白质和核酸等。

9.2.2 原核生物基因表达的调节

原核生物基因表达调节以 1960~1961 年提出乳糖操纵子模型为代表。

Jacob 和 Monod 等对大肠杆菌乳糖发酵过程酶的诱导合成及各种突变型研究之后，提出了操纵子模型。细菌在含有葡萄糖的培养基中生长优先利用葡萄糖，只有当葡萄糖耗尽并经一停滞期之后才利用乳糖，这就是所谓的葡萄糖效应。这是由于葡萄糖的降解物抑制了乳糖代谢相关酶的基因指导 mRNA 合成。葡萄糖的哪种降解物起这种作用至今不清楚，初步认为与降低 cAMP 的水平有关。当培养基中葡萄糖耗尽时，乳糖既是底物又是诱导物的前体。经 β -半乳糖酶作用将乳糖（葡萄糖-1, 4-半乳糖）转变为异构化的乳糖（葡萄糖-1, 6-半乳糖）。异构半乳糖和乳糖代谢相关酶基因的阻遏物结合，改变了这种阻遏物的空间结构，使其不能和乳糖代谢相关酶的基因结合，从而打开了该基因。这里必须注意到，半乳糖异构化所需的 β -半乳糖酶之所以一直有少量存在，说明该基因的关闭是相对的。

操纵子模型的核心是对原核生物基因的划分。该模型将原核生物基因分为结构基因——指导酶和蛋白质表达产物的合成、操纵基因——负责结构基因的“开”和“关”、启动基因（启动子）——结合转录酶和启动转录、调节基因——负责调节物质如阻遏蛋白的合成。一个操纵子包括全部相关的结构基因、操纵基因、启动子和调节基因，形成一个基因表达的控制单位。

后来十余年的基因结构分析证实并丰富了这一模型。继乳糖操纵子之后，又发现了色氨酸操纵子、半乳糖操纵子、阿拉伯糖操纵子、组氨酸操纵子、rRNA 操纵子等。不仅如此，通过对各种操纵子一级结构的分析和多种原核生物全部 DNA 的测序，同时发现了衰减子、多启动子等新的调节转录的基因，从而肯定了操纵子模型，使原核生物基因表达调控的转录水平调控有了根本突破。现在操纵子模型已经用于基因工程。

虽然用乳糖操纵子可以说明操纵子模型，但要全面深入了解原核生物基因表达调控，其他操纵子也要有一定了解，但只需对照乳糖操纵子，注意每种操纵子的特点即可。

乳糖操纵子 这个操纵子有 Z、Y、A 三个结构基因。转录时形成同一条 mRNA。三个结构基因分别代表 β -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷透性酶、 γ -半乳糖苷转乙酰酶。结构基因的上游紧接着为操纵基因，其次是启动子，再往前是调节

基因。操纵基因是阻遏物结合位点，调节基因是阻遏物合成基因。已知启动子区 82bp 长，处于 $-82 \sim +1$ (P 区)，其中 $-67 \sim -52$ 为 cAMP-CAP 复合物（分解代谢活化蛋白）结合区。阻遏物结合区 (O 区) 在 $-7 \sim +28$ ，此区平时被阻遏蛋白结合，经诱导后才打开。调节基因是单一的转录单位，mRNA 翻译后可得到 347 个残基的多肽，形成 4 聚体后成为有活性的阻遏蛋白。阻遏蛋白中 α 螺旋化的氨基酸基伸入到 DNA 的大沟中并与碱基形成氢键。

色氨酸操纵子 乳糖操纵子是可诱导操纵子，色氨酸操纵子则为阻遏操纵子。正常情况下，色氨酸操纵子是“开”着的。当培养基中添加色氨酸或色氨酸合成量过大时，这一操纵子关闭。负责色氨酸合成的 5 种酶的结构基因紧密连锁，转录时形成一条 mRNA 分子。5 种酶分别为邻氨基苯甲酸合成酶 (trpE)、邻氨基苯甲酸焦磷酸转移酶 (trpD)、邻氨基苯甲酸异构酶 (trpC)、色氨酸合成酶 (trpB) 和吲哚甘油-3-磷酸合成酶 (trpA)。trpE 的上游近邻启动子区和操纵子区，调节基因 (trpR) 处于染色体 90 分区域。另外一个行使调节的基因在 65 分区，叫做 trpS，这个基因是色氨酸 tRNA 合成酶基因。trp 也参加操纵子的调节，操纵子有前导区和衰减子区 (TrpL, TrpA)。色氨酸操纵子的调节基因实际上有四个 (TrpL, TrpA, TrpR, TrpS)。TrpL 162bp 长，转录形成的 mRNA 和结构基因 mRNA 相连且处于 5' 端。TrpL 的 mRNA 的碱基组成很特殊，它的 4 个区段可以两种方式形成局部配对而产生两种茎-环结构，配对的部分成茎，不能配对的部分成环。另外，TrpL 中有两个相邻的色氨酸密码子，翻译时对 tRNA^{trp}、trp 的浓度敏感，当色氨酸浓度很低时，tRNA^{trp} 的负载减少，翻译时核糖体通过这两个色氨酸密码子的速度减慢；当色氨酸浓度高时，核糖体可顺利通过两个相邻的色氨酸密码子，由于 trpL 的 mRNA 的 1、2、3、4 四个区之间的配对出现 1 和 2，3 和 4 形成的茎-环结构时只有 3 和 4 形成的茎-环结构能使 RNA 聚合酶作用终止，而高浓度色氨酸时才能形成 3 和 4 之间的茎-环终止转录结构，故高浓度时转录终止在 3 和 4 之间的茎-环结构之前。同理，低浓度色氨酸时 3 和 4 之间的茎-环结构不能形成，转录可继续进行。这一调节过程叫做衰减作用或弱化作用，trpL 被叫做衰减子或弱化子。

色氨酸操纵子另外一种调节方式为阻遏。trpR 的产物为辅阻遏蛋白。当有色氨酸时，辅阻遏蛋白才能与色氨酸结合并形成能与操纵基因相结合的活性阻遏蛋白。

衰减式调控为 trp 操纵子的细调控，阻遏蛋白的调控为粗调控。

苯丙氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸有关基因中都存在衰减子。两种调节系统同时存在的原因至今不清楚。

半乳糖操纵子 前面两种操纵子的启动子只有一个，半乳糖操纵子有两个启动子、两个操纵基因，调节基因远离结构基因。

大肠杆菌的半乳糖操纵子有三个结构基因：异构酶（*galE*）、半乳糖一磷酸尿嘧啶核苷转移酶（*galT*）、半乳糖激酶（*galK*）。三个酶作用的最终产物是葡萄糖-1-磷酸。调节基因为 *galR*。一个操纵基因在 -67~-53 处，一个处于结构基因 *galE* 内部。两个启动子相互重叠。启动子 1 在有葡萄糖时不起始转录，启动子 2 恰好相反。因此在有葡萄糖时，*gal* 操纵子能够表达。

为什么半乳糖操纵子需要两个启动子？这与半乳糖的双重作用有关。半乳糖可以作为细菌的碳源，另一方面 UDPGal 又是合成细菌细胞壁的一个重要前体。无半乳糖时，细菌必须将自己的 UDPGlc 在半乳糖异构酶（基因为 *galE*）作用下转变成 UDPGal。因而细菌必须在低水平下不断地合成 *galE* 的表达产物——半乳糖异构酶，这正好是启动子 2 所能启动的，它不因有葡萄糖而被关闭。

调节基因的表达产物可扩散，故和结构基因的距离远近无关紧要。

gal 操纵子的诱导物主要是半乳糖。

阿拉伯糖操纵子也为可诱导型。其最大特点是调节基因 *araC* 的表达产物同时具有正负两种调节作用。这是由于此种蛋白质有两种异构体，Pr 和 Pi。Pr 起阻遏作用，Pi 起诱导作用。两种异构体和阿拉伯糖如何诱变尚不清楚。

RNA 操纵子有两个启动子，第一启动子为强启动子，第二启动子为弱启动子。

核糖体蛋白 SI 操纵子有 4 个启动子，前两个为强启动子，后两个为弱启动子。

Dna 蛋白操纵子有三个启动子，也有强弱之别。

随着原核生物基因表达调控研究的继续深入，会有更多的操纵子被发现，操纵子的详细结构也会不断被揭示，但基本的内容为：①操纵子的基因组成和基因结构；②各种基因的位置、大小数目和彼此之间的关系；③操纵子内部调节的机理；④调节物的结构。

通过比较，可以从中找出每种操纵子的特点。熟悉了乳糖操纵子和色氨酸操纵子两个代表性的操纵子，其他操纵子只需知道不同点即可。

原核生物基因表达调节研究的另外一方面是病毒。通过对病毒的基因表达调控深入了解，人们发现了原核生物基因表达的另外一种方式——时序调控。时序调控揭示了原核生物基因表达的先后顺序，即随着不同的生活时期、生活习性，成套基因有顺序的表达。这一特点，对于真核生物基因调控有重要参考价值。多细胞、高度分化的真核生物从发育到成熟直至死亡，历经明显不同的生活阶段，所处的生活内外环境不断变化，必然存在一种高级的时序调控方式。

已知的原核生物时序调控有三种方式：①用新的蛋白质因子代替 RNA 聚合酶原来的蛋白质因子，使 RNA 聚合酶在自身不变的情况下识别新的启动子；②合成新的 RNA 聚合酶，启用新的启动子；③合成新的调控因子，改变 RNA 聚

合酶转录终止子的终止位点。

δ 因子控制的时序调控 细菌仅一种 RNA 聚合酶，而 δ 因子不仅一种，如大肠杆菌除了 δ^{70} 外，又发现了 δ^{32} ，专门识别 17 种热休克基因启动子。从 *B. subtilis* 中已发现至少 7 种 δ 因子，这些 δ 因子在生活史的不同阶段发挥作用。

RNA 聚合酶控制的时序调控 T_7 噬菌体的生长周期中早晚有不同的 RNA 聚合酶。早期使用寄主大肠杆菌的 RNA 聚合酶，此时开动的基因提供自身复制所需的蛋白质。晚期使用自身编码的 RNA 聚合酶，开启 17 种晚期基因。这些基因编码的复制所需的酶和噬菌体颗粒的结构蛋白及抑制寄主 RNA 聚合酶的物质。 T_7 噬菌体进入寄主所需的时间较长，达 10 分钟，而一般噬菌体侵染需 1 分钟。 T_7 噬菌体 DNA 缓慢进入寄主细胞是基因时序控制表达的重要原因和手段。

新的蛋白质因子控制的时序表达 λ 噬菌体进入大肠杆菌后，可以有两种情况：第一种是 λ -DNA 整合到细菌染色体上并随染色体 DNA 一起复制，这种整合有噬菌体基因的细菌称为溶原细菌，这一过程称为溶原途径。溶原细菌一般不再被噬菌体感染，此现象称为免疫性。进入细菌内的 λ -DNA 如果不整合进寄主染色体中，而是利用寄主的条件进行复制，最终使宿主裂解而死亡，这一过程称为溶菌途径。溶原性细菌在一定条件下可转变为溶菌，实现这一过程叫做诱导。

λ -噬菌体的 DNA 呈双链线状，48.5kb，全部序列已知。两条链都有遗传编码，R 链向右转录，L 链向左转录，共有 4 个操纵子：阻遏蛋白操纵子是 λ -基因组的总控区；早左操纵子编码与细菌 DNA 重组、整合、割裂等有关的基因；早右操纵子编码与 λ -DNA 复制有关的基因；晚期操纵子与溶菌有关。 λ -噬菌体并没有编码 RNA 聚合酶的基因，而是对宿主的 RNA 聚合酶进行抗终止性的修饰。 λ -噬菌体有 6 个启动子，有两个负责向左和右转录，有两个仅负责向左转录，有两个仅负责向右转录。 λ -噬菌体有三个调节基因，N、Cro 和 θ 。N 蛋白质抗终止子 t_l 、 t_{R1} 和 t_{R2} ， θ 蛋白抗终止 t_{R4} ，Cro 蛋白对 CI 和 Cro 基因的转录起负调控作用。CI 蛋白抑制与 DNA 复制、成熟和裂解有关基因的转录，使 λ 噬菌体处于溶原状态，是一种阻遏蛋白，由两个相同的亚基（236 个残基）组成。Cro 蛋白由 66 个残基组成，为二聚体。

λ -噬菌体的基因表达时序调控的主要途径是抗终止子，即抑制 ρ (ρ) 因子的作用。这是理解 λ -噬菌体基因表达时序调控的关键。正常终止被抑制，便会出现通读，通读进行到一定部位后终止，被转录的基因增多。具有抗终止子作用的因子为调节基因 N 和 θ 编码的 PN 和 θ 蛋白。PN 蛋白使早期转录越过依赖于 ρ 因子的三个终止子 (t_{L1} 、 t_{R2} 、 t_{R3}) 而进入晚、早期基因转录，晚早期转录使另一个抗终止子蛋白的调节基因 θ 被转录，其表达产物为 θ 蛋白。 θ 蛋白使

晚、早期转录越过 tR_4 而使得转录进入晚期。早期转录—晚早期转录—晚期转录三个阶段完成之后， λ -噬菌体的裂解周期完成。目前所谓的 λ -噬菌体基因表达调控是针对裂解周期的完成而言的，而溶原过程目前了解的不多。

已知的 λ -噬菌体溶原过程是用 λ -噬菌体的两个阻遏物 CI 蛋白和 Cro 蛋白来说明的。CI 蛋白和左、右向操纵基因结合，使 λ -噬菌体 DNA 不能转录，而且使再次进入溶原菌的新的 λ -噬菌体不能复制，从而获得免疫性。Cro 蛋白对 CI 基因转录进行抑制，阻止 CI 蛋白的合成，使溶原状态消除而进入裂解状态。CI 蛋白和 Cro 蛋白的浓度比与 λ -噬菌体在宿主中以溶原还是溶菌状态密切相关。当用紫外线等因素使 CI 基因突变后， λ -噬菌体进入溶原态。

原核生物转录后的调控 已知原核生物基因表达调控以转录水平为主，但转录后的调控仍然是应当考虑的。比较肯定的转录后调控有以下几种方式：①稀有密码子对翻译的调控。原核生物利用稀有密码子编码需要量较少的表达产物，尽管这些表达产物和需要较多的表达产物同处一个操纵子，但由于细胞内对应于稀有密码子的 tRNA 较少，从而限制了这些蛋白质的合成。大肠杆菌的编码 RNA 引物酶的 DnaG 基因序列内含较多的稀有密码子。②反义 RNA 的调控作用。反义 RNA 是指与靶 RNA 是有互补序列的调控 RNA。反义 RNA 通常和 rRNA 的 SD 序列、起始密码子 AUG 和 N 端的部分密码子相结合，从而抑制了 mRNA 的翻译。反义 RNA 也可使转录提前终止。反义 RNA 调控作用见于大肠杆菌中与渗透性有关的外膜孔蛋白合成调节。其中起调节作用的是一个 174 残基长的 RNA。③魔斑核苷酸水平的调节作用。大肠杆菌营养缺陷型研究发现缺乏氨基酸时，鸟苷四磷酸 (PPGpp) 和鸟苷五磷酸 (PPPGp) 合成。这两种化合物在层析时检出的斑点称为魔斑，这是由空载的 tRNA 和核糖体无效结合，致使肽链延伸所需的 GTP 被转化成这两种物质。这两种物质的合成警告细胞抑制核糖体和其他大分子合成，活化缺乏的氨基酸的操纵子转录表达。科学上的所谓细胞的严紧控制实际上就是一种应急的反应，ppGpp 与此有关。

9.2.3 真核生物基因表达调控

大量研究表明，真核生物基因表达仍以转录水平为主。对大多数真核生物说来，在特定时间、特定的细胞激活特定的基因是基因表达调控的关键和核心。这一点类似于原核生物的时序调控。

由于至今尚不能完全肯定真核生物有无原核生物那样的操纵子，加之真核生物 DNA 序列的测定还不能像原核生物那样全面和详细，真核生物的基因组分布在数条 DNA 分子上，mRNA 呈单顺反子，富有重复序列，转录后加工复杂等，真核生物基因表达调控的知识还较零散和浮浅。目前尚不能从某一个方面做出肯

定和较全面地解释。

DNA 水平的调控 包括基因丢失、基因扩增、基因重排和变换，真核生物 DNA 在分化和发育过程中出现的不可逆变化有可能来自这些原因。

顺式作用元件的调控 顺式作用元件是指真核基因中具有调控作用的特定 DNA 序列，如增强子、类增强子、Britten 和 Dauideon 1969 年提出的感受激素等信号分子的传感基因（它类似于原核生物的 cAMP-CAP 结合位点）、启动子等，这些特定序列以自身的序列结构和空间构象发挥调节作用，或者和反式作用元件一起发挥作用。

反式作用元件的调控 如启动子区结合蛋白、具有锌指结构的 TF_{II}A 蛋白、热休克蛋白（HSP）、激素等，反式作用元件和顺式元件相结合而发挥作用。

翻译水平的调控 真核生物核糖体对第一个起始码子 AUG 的扫描式辨认用来解释为什么真核生物核糖体不能同时合成一组相关的蛋白质。mRNA 的 5' 帽子结构可以提高 mRNA 的翻译效率。mRNA 5' 先导序列（由帽子到起始码之间的核苷酸序列）的一般结构可能与翻译起始位点识别有关。

翻译后蛋白质的加工成熟 这部分内容在蛋白质生物合成中已涉及，在此作为一种调节方式来重新理解。多肽的切割与蛋白质分泌和蛋白质的活化有关，除去信号肽和使酶原转化为酶是已知最基本的切割。多肽的化学修饰包括酯化、糖基化。多肽的剪接不是从一端或某一位点的切割或修饰，而是肽片段之间的重排。

9.3 激素调节

激素不仅存在于动物，而且存在于植物，不仅存在于动物的内分泌系统，而且存在于其他系统的组织中。

激素有两方面的调节作用，同一激素可使某些代谢加强，使另一些代谢减弱。激素的双向作用是由于受体不同而产生的。有的激素受体在膜上，有的激素受体不在膜上。

9.3.1 生物信息

生物信息有两类，一类是遗传信息，一类是来自细胞外的信号。细胞外信号分子有两大类，一类是甾体激素，另一类是蛋白质、肽和生物胺等。细胞内的信号分子称作第二信使。有 cAMP、Ca²⁺、IP₃、DG、cGMP 等。细胞外信号分子相当于第一信使。

信号分子起作用首先要和受体结合。受体分为膜受体和胞内受体。信号分子

和受体作用有专一性、饱和性、可逆性、可置换性和放大性。

已知的受体有四类：

离子通道 如烟碱型乙酰胆碱受体（N受体）、 γ -氨基丁酸受体（GABA受体）、甘氨酸受体等，均属激动剂类受体。这类受体实际上是一种数个微区组成的跨膜蛋白。主要与神经递质有关。

与 G 蛋白相偶联的受体 如肾上腺素受体（ α 和 β 多体）、毒蕈碱样胆碱受体（M受体）、阿片受体。这类受体的特点是受体和激素的复合物诱导 G 蛋白活化，进而通过第二信使（ Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、DG、 IP_3 、花生四烯酸）进行传递和放大。

酪氨酸蛋白激酶活性受体 如细胞生长因子和细胞因子受体。

胞内受体 如甾体激素受体。

现已基本肯定，受体的本质是膜蛋白或膜内蛋白。膜蛋白类受体属嵌入蛋白，可分胞外、胞内和跨膜三个片段。胞外片段糖基化，跨膜片段含有疏水结构。胞内受体中的甾体激素受体初步认为是一个蛋白质超家族。它们的一级结构有很大的同源性。都有三个结构域：N 端为调节区，C 端为激素结合区，中间为 DNA 结合区。调节区差别较大。已知的受体组分有 G 蛋白、蛋白酶、甾体受体超家族等。

9.3.2 G 蛋白

G 蛋白由 α 、 β 、 γ 三个不同的亚基组成。 β 和 γ 亚基结合紧密且差别不大。 α 亚基是功能和差别的主要表现者。 α 亚基有 GTP 酶活性，使 GTP 解成为 GDP 后亚基与 GDP 结合，故名 G 蛋白。G 蛋白是一类蛋白，至今仍有新的 G 蛋白被陆续发现。

G 蛋白初步分类如下： G_s 促进腺苷酸环化酶活性； G_i 抑制腺苷酸环化酶活性； G_t 参与视网膜光感受器的信息跨膜传递； G_g 与味觉有关； G_p 与磷脂酶活化有关； G_o 抑制 Ca^{2+} 流及其他作用。

G 蛋白介导的信号传递系统有：①磷脂酰肌醇系统；②通过磷酸二酯酶控制 cGMP 的视紫红质系统；③腺苷酸环化酶（ACase）系统。G 蛋白介导的上述三种信号传递系统彼此之间有一定联系， Ca^{2+} 浓度的变化是其中最普遍的联系。G 蛋白本身、cAMP、DG、 IP_3 都可影响到 Ca^{2+} 浓度。

第二信使 cAMP、cGMP、 IP_3 、DG 分别将激素信号进一步传递给蛋白激酶 PKA、PKG 和 PKC。这三类激酶对应的激素均以 G 蛋白为介导。另外一种蛋白激酶叫做酪氨酸蛋白激酶（TPK），不需 G 蛋白作为激素的介导，其本身既是介导者和受体，又是第二信使，且具有蛋白激酶活性，集三种作用为一体。

四类激酶（PKA、DKG、PKC、TPK）可使底物磷酸化。前三类磷酸化的位点为 Thr 或 Ser 残基的羟基，TPK 磷酸化的位点是 Tyr 残基的羟基。底物也可以是酶，如 PKA 使无活性的磷酸化酶激酶磷酸化后成为有活性的磷酸化酶 b 激酶，磷酸化酶 b 激酶使无活性的磷酸化酶 b 转变成有活性的磷酸化酶 b，磷酸化酶 b 使肝糖原水解为葡萄糖-1-磷酸，这一过程使激素信号逐级放大，即级联放大效应。而 TPK 既可使自身磷酸化，又可使 PKA、PKC 磷酸化，PKA、PKC 反过来又调节受体的激酶活性。四类蛋白激酶的结构还正在研究之中。

9.3.3 甾体激素受体超家族

G 蛋白和蛋白激酶二类受体成分都在膜上。甾体激素受体在胞内。已知甾体激素在一级结构上有同源性，空间结构有类似性，故称为甾体激素受体超家族。甾体激素受体的 DNA 结合区由 66~68 个富含碱性氨基酸和半胱氨酸的残基组成，内含两个锌指结构（CI、CII）。CI 决定结合 DNA 的特异性，CII 稳定 CI 和 DNA 的结合，调节区和激素结合区了解得不多。

9.3.4 第二信使的生物学功能

cAMP 真核生物和原核生物细胞内广泛分布有 cAMP，可以通过 PKA 调节多种代谢关键酶的活性，在糖、脂代谢中发挥双重调节作用。某些二、三级的激素的合成大多受 cAMP 调节。突触膜上的 PKA 活性受 cAMP 调节，进而影响神经递质的合成、释放和传递。cAMP 可调节基因活性，Lac 操纵子的 CAP 可受 cAMP 激活。一般说来，PKA 具有的作用均与 cAMP 有关。

IP₃ 和 DG IP₃ 的主要功能是动员内质网中储存的 Ca²⁺ 的释放，启动 Ca²⁺ 信号系统。DG 的主要功能是激活 PKC，其次是经酯酶水解生成花生四烯酸、白三烯等调节物质。PKC、花生四烯酸和白三烯的功能等于是 DG 的功能。PKC 活化也需 Ca²⁺。

Ca²⁺ Ca²⁺ 有时作为第二信使，有时作为第三信使。内质网、线粒体内富含 Ca²⁺。Ca²⁺ 从胞外进入胞内经电压门控和受体门控两种膜通道。受体门控通道受激素和神经递质调节，与 IP₃ 和 cAMP 两种第二信使有关。Ca²⁺ 的功能在调节作用方面分为独立和辅助两种方式，独立作用见于激活 PKC、PLC 和 PLA₂ 酶等，辅助方式见于以钙结合蛋白形式发挥作用。钙结合蛋白是一家族，均具有“EF”手形结构，在神经递质和激素信号传递、细胞发育和分化中发挥作用。钙结合蛋白之一钙调蛋白（CaM）是一种膜蛋白，可以调节 G 蛋白、磷酸二酯酶的活性，使 cAMP 的浓度增加和降低。CaM 也可使另外多种激酶的活性发生变

化,从而对糖原代谢,细胞运动等进行调节。

9.3.5 磷酸化与脱磷酸化

通过对激素化学、神经递质化学、其他细胞外信号分子化学及膜受体结构和作用及第二、三信使作用的了解,从中不难看到,细胞外信号分子调节作用的最终归宿主要是蛋白质磷酸化问题。不论通过何种激素,何种第二信使,几乎都可以用蛋白质、酶的磷酸化统一起来。蛋白质磷酸化作用,使所有的生命活动包括癌变受到调控。认识到这一点,便会对错综复杂的细胞外信号分子调节作用有了根本的和系统的认识。由此可以进一步认识到,生物体中的磷酸化作用,不仅是小分子有机物代谢和发挥作用时活化的主要方式,也是蛋白质等生物大分子代谢和发挥作用的基本方式。磷酸化—脱磷酸化的研究在生命化学中意义重大。

9.4 癌变与代谢调节

癌变的机理虽有多种解释,有外因作用,有内因作用,但迄今认识最深刻的是从内因作用的解释,这就是癌基因。外因通过内因起作用,DNA 分子的序列有可控和所需的一面,同时也有不利和有害的一面,特别是潜在的危险更为有害。即使某生物个体原本也许没有这样的 DNA 序列,但在进化和生长发育中有可能因外因而附加了这样的序列。DNA 序列中能转变为致癌序列的序列叫做癌基因。近年来对癌基因的研究进一步证实了癌变是一种代谢失调,是基因表达调控失调,是癌基因高效过量表达,导致细胞无限制增殖,这些失调的机理和过程类似于细胞外信号分子的作用。

9.4.1 癌 基 因

癌基因可分为两大类:一类是病毒癌基因(V-onc),使宿主细胞发生恶性增殖,这是外来 DNA 序列作用于宿主 DNA 序列之后产生的宿主基因表达失调,这些外来的 DNA 序列有的类似于增强子和启动子序列,根本来源初步证实还是来自宿主,是本次侵入之前从其他宿主 DNA 分子上带走的,原处在动物和人体中的这些癌基因叫原癌基因;第二类癌基因是细胞转化基因,可能是人体正常细胞中原癌基因的突变产物,这类基因属看家基因(管家基因),担负细胞生长和分子的调控作用,受物理、化学刺激后可活化,如果这种活化出现在原本应当受到抑制的时期,就成为一种癌变。

9.4.2 癌基因的表达产物

有两种划分方法,如根据这些表达产物所处的位置可分为膜结合蛋白,胞内可溶性蛋白和核蛋白,根据其功能,分为酪氨酸激酶型(TPK/PKT,基本上由膜结合蛋白和胞内可溶性蛋白组成)、生长因子、GTP结合蛋白、核蛋白。癌基因产物诱发一系列与细胞生长分化有关的基因表达为其共同作用特点,和细胞外信号传递和作用过程相比,癌基因产物有些就是产生细胞增殖信号的信使物质,有些就是蛋白激酶,有些是DNA结合蛋白。神经递质,激素的信使物质无论产生兴奋还是抑制,活化还是失活,都是在正常范围的调节,而癌基因产物引起的调节是不良的,恶性的调节,是一种代谢调控的失调,在细胞学上是一种逆分化或曰反分化。

9.4.3 抑癌基因

癌基因证实之后,又发现抑癌基因。抑癌基因的表达产物抑制癌基因表达,所以癌变也会因抑癌基因突变而产生。

9.5 蛋白质与DNA的相互作用

在对代谢调节有了全面认识之后,提出了一个需要深入认识的问题,也是当今分子生物学在真核生物基因调控中必需解决的难题——蛋白质与DNA的相互作用。真核生物DNA明显不同于原核生物之处在于有染色体结构,染色体中不仅有DNA,而且有蛋白质。无论真核生物基因调控研究从何种水平进行,最终都要归于这种调控是作用于DNA本身还是作用于和DNA相结合的蛋白质,如组蛋白。大量的研究事实表明,尽管也有像反义RNA那样的核酸-核酸之间的调节作用,但对真核生物说来,蛋白质与DNA的相互作用是最重要的。

已知的能够识别DNA特定序列并与之结合的蛋白质有多种。前述的转录因子,转录调节因子等反式作用元件已有评述,现已完全肯定的这些蛋白质有下列几种结构域。

螺旋—转折—螺旋(HTH) 最早发现于原核生物Cro蛋白,Lac、 λ -噬菌体的阻遏蛋白。真核生物转录调控因子的同源盒结构也有这种结构。HTH的1~7和12~20为两个螺旋区,其中一个螺旋区和DNA特异性区的碱基结合,另一螺旋的氨基酸残基与DNA的磷酸戊糖骨架进行非特异性结合。这些蛋白质常以二聚体方式作用,和DNA特异性区碱基结合的螺旋嵌入到DNA的大沟内,

氨基酸残基与大沟内碱基之间形成氢键、盐键和范德华力，这些作用力的产生影响了两条 DNA 链中原有的碱基对间的氢键作用。由于 α -螺旋中哪些残基能和哪些碱基形成氢键与双方递氢和受氢的能力有关，所以有专一性，由此提供了双方的相互识别。当然也与双方相互靠近时的位置、方向有关。所以 α -螺旋与 DNA 的非特异性结合是一种对特异性识别作用的协助。

锌指结构 锌指结构有两类，第一类是 Zn 原子与两个 Cys、两个 His 残基结合。这样的锌指结构在同一蛋白质中往往有 3 个或 3 个以上，一个这样的结构单元需要大约 30 个残基。第二类是 Zn 原子与 4 个 Cys 相结合，一个这样的结构单元需要大约 70 个残基，Zn 的作用是使蛋白质分子形成指形构象的骨架以便同 DNA 结合。锌指结构可沿 DNA 大沟旋绕，一个锌指结构和 5bp DNA 序列平行，这些 DNA 序列富 G 和 C。锌指结构也可能仅仅是帮助了该蛋白的其余部分具有和 DNA 相结合的构象。

亮氨酸拉链结构 每隔 7 个残基出现一个 Leu，形成螺旋之后使 Leu 在螺旋一侧排成一列，一个这样的结构单元需要 30~40 个残基。在与启动子、增强子特异结合的蛋白质中常有这样的结构单元，有这种单元的蛋白质常另有一个 30 残基长的碱性残基区。初步认为是由这一区域真正和 DNA 结合，而亮氨酸拉链结构仅与此类蛋白稳定形成二聚体有关。

除上述三种结构域外， β 折叠、螺旋—环—螺旋等结构也同 DNA 结合有关。

综上所述，蛋白质与 DNA 的结合主要是氨基酸残基与碱基之间形成氢键。

9.6 生物大分子结构数据库与生物信息学

9.6.1 生物大分子结构数据库

随着蛋白质、核酸、糖的结构研究深入进行，大量积累的结构数据已经发展成为数据库 (database)，世界上已经建立的被广泛采用的数据库有蛋白质、核酸、糖结构数据库。在近几年的研究生入学考试和复试题中，已经开始包括这些知识。复习时只要做到知道什么叫做生物大分子数据库，世界上有代表性的生物大分子数据库有哪些，生物大分子数据库的作用与信息生物学的关系，信息生物学研究的内容有哪些即可。

(1) 蛋白质数据库

SWISSPROT 蛋白质一级结构数据库 1993 年由瑞士日内瓦大学建立。

PIR (protein identification resource) 蛋白质一级结构数据库 1987 年由美国、日本和德国共同建立。

PDB (protein data bank) 蛋白质晶体结构数据库

DSSP 蛋白质二级结构指认数据库 1983 年由 Kabsch 和 Sander 建立。

(2) 核酸数据库

EMBL 核酸序列数据库 1980 年由德国海德堡欧洲分子生物学实验室建立。

GeneBank 核酸序列数据库 1982 年美国国立卫生研究院等建立。

9.6.2 生物大分子结构数据库的作用

(1) 记录、查询 当发现一种新的生物大分子时，需要和已知的进行对照，以便确认是最新发现，当得知是最新发现时，进行登记注册。

(2) 整理 当同一类大分子的结构数据开始积累时，要不断进行数据整理，以利存档和共同使用。

(3) 基础研究 通过对比研究可已发现生物大分子结构相互关系和寻找内在规律。

9.6.3 生物信息学

生物信息学是生物大分子结构数据大量积累基础上形成的一门新兴交叉学科。通过计算机技术和数学知识的运用，对已知的生物大分子结构数据库进行分析研究，旨在探讨生物大分子结构信息。

生物大分子结构信息包括序列平面结构和携带生物信息的关系，序列结构之间的相互进化关系，序列结构和配体之间的关系，序列结构与立体结构的关系，立体结构和生物学功能的关系等。

掌握生物大分子结构信息，可以实现结构预测，如通过蛋白质一级结构预测空间结构，减少今后蛋白质空间结构直接测定。可以全面解读生物大分子序列语言的语法，如三联体遗传密码的逗号、句号，编码区、非编码区的序列特点，这是了解目前最为关注的基因调控机理的基础。可以改造自然界生物大分子，如各种高耐受性酶的生产。可以从头设计生物大分子结构，创造超自然的生物大分子，如新药的设计合成，生物材料的设计合成。甚至可以创造出超自然的生物。

第十章 习题类型与解答要点

10.1 计 算 题

10.1.1 pH 和 pI 的计算

此类题的解答首先要明确 pH 和 pI 的定义和关系:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_1 + \text{pK}_2}{2} \quad \text{K}_1、\text{K}_2 \text{ 为等电点状态离子两侧解离常数}$$

例: 如何配制 pH=3 的 HCl 溶液? (用 28%, ρ 为 1.15 的 HCl 配制)

解: HCl 是强酸, pH=3, 即 $M=0.001$ 。以 1 升为例说明: 1 升 pH=3 的 HCl 溶液的摩尔数为 0.001, 原盐酸的摩尔浓度为

$$M = \frac{1000 \times 1.15 \times 0.28}{36.5} = 8.82$$

配制 1 升 0.001M 的 HCl 需要原盐酸的体积为

$$V = \frac{0.001}{8.82} = 0.00011\text{L} = 0.11\text{ml}$$

即取 28% 的 HCl 溶液 0.11ml, 稀释至 1000ml。

另外可这样计算: 1 升 pH3 的 HCl 溶液所含 HCl 的重量为

$$0.001 \times 36.5 = 0.0365 \text{ (g)}$$

采用 28% 的 HCl 所需的 HCl 重量为

$$\frac{0.0365}{0.28} = 0.13 \text{ (g)}$$

采用比重为 1.15 的盐酸所需体积为

$$\frac{0.13}{1.15} = 0.11 \text{ (ml)}$$

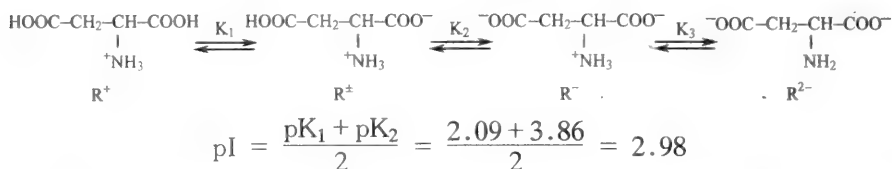
例: 10^{-9}mol/L HCl 溶液的 pH 是多少?

解: 根据 $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ 定义, 很容易误认为 pH=9, 实际上是错误的, 因为无论怎样稀释, 对于强酸来说, 也不会使其变成碱性, 水的 pH 一般为 7, 所以答案是 7。

例: 计算天冬氨酸的等电点 ($\text{pK}_1=2.09$, $\text{pK}_2=3.86$, $\text{pK}_3=9.82$)。

解: 计算两性化合物等电点, 首先要知道要计算的化合物的结构式, 其次是

记清每个可解离基团的解离顺序。一个简便的方法是，计算之前首先写出解离式，最好是从完全质子化一侧向完全非质子化一侧书写。如：



说明：为方便起见，记住“两羧基—氨基氨基酸等电点偏酸，两氨基—羧基氨基酸等电点偏碱”很有用，对于 Asp 自然会用两个羧基 pK 值之和的一半来表示 pI。这两个 pK 处在等电点状态两侧。

10.1.2 静电荷计算

在离子交换和电泳实验中，被分离检测的物质主要靠分子所带静电荷进行区别，正确计算静电荷的方法很多，常用的公式是：

$$\Delta p = \text{pI} - \text{pH}$$

这是用氨基酸（或其他两性化合物）pI 和所用缓冲液 pH 进行比较，如果 Δp 为正，则氨基酸带正电荷，反之则带负电荷。当 Δp 为正时，相当于在静电荷为零时加入酸，所以带正电荷。如果能理解到这一水平，此公式无需死记了。

例：将 Asp、Thr、Ile 三种氨基酸的混合液（在 pH3.0 的缓冲液中）通过 Dowex-50 阳离子交换柱，当用同样的缓冲液洗脱时，三种氨基酸的洗脱顺序如何？

解：查表知 Asp pI=2.98，Thr pI=6.53，Ile pI=5.98，求 Δp

$$\text{Asp } \Delta p = 2.98 - 3 = -0.02$$

$$\text{Thr } \Delta p = 6.53 - 3 = 3.53$$

$$\text{Ile } \Delta p = 5.98 - 3 = 2.98$$

三者所带净正电荷的排序是：Thr > Ile > Asp，所以仅考虑净电荷洗脱下来的顺序是 Asp > Ile > Thr。

但是，离子交换不仅与净电荷有关，还需要考虑离子交换树脂的疏水部分与氨基酸的疏水部分相互作用。所以，上述顺序应调整为 Asp > Thr > Ile。

说明：Thr 有 —OH 基，其亲水性大于 Ile。通过此题可以看到，熟记各种氨基酸的结构式是多么的重要，单靠死记公式是不行的。

例：已知某氨基酸等电点为 4，在 pH 为 7 的水溶液中，这种氨基酸分子带何种净电荷？电泳时，在 pH 为 7 的缓冲溶液中会向哪一极移动？

解：在 pH7 的水溶液中，此氨基酸分子带负电荷。在 pH7 的缓冲液中电泳

时, 此氨基酸向正极移动。

说明: 等电点为 4, 说明此种氨基酸有 α 位以外的羧基类基团, 为了使其解离时到达等电点, 必须加入酸, 故等电点偏酸, 此氨基酸处在 pH7 的水溶液中, 等于是加碱, 促使了该氨基酸失去 H^+ , 所以带负电荷, 在 pH7 的缓冲液中, 带负电荷的此氨基酸自然向正极移动。

等电点知识是生物化学中的一个难点, 由于广义酸碱概念一般说来较难理解, 不少的学生总是受到过去的酸根, 碱根的束缚, 误将 $-COO^-$, $-SO_3^-$ 当做酸根 $-COOH$, $-SO_3H$ 对待, 将 $-NH_3^+$ 作为碱根对待。另外, 在已知等电点偏酸时, 为了达到等电点要加酸的道理感到不好理解, 解决这些困难, 必须深刻理解广义酸碱、等电点和两性解离这些概念。

例: 三种氨基酸的混合液在 pH5.7 时进行电泳后 (Ala $pI=6.02$, Arg $pI=10.76$, Ser $pI=5.68$), 它们在醋酸纤维薄膜上的排列顺序如何?

解: Ser 留在原点不动, 因为 $pI=pH$; Arg 向负极移动最快, 随后是 Ala。

说明: $pI=pH$ 时净电荷为零, $pI>pH$ 时净电荷为正。

10.1.3 肽和蛋白质的多样性

肽和蛋白质是由 20 多种氨基酸合成的, 因每种肽和蛋白质中残基的种类、每种残基的数量、相互排列的顺序不同, 可知自然界蛋白质的种类是相当多的, 根据已知的残基种类数和链长估计会有多少种蛋白质, 在数学上是一个排列问题。

例: 3 种氨基酸可组成多少种直链三肽? (a) 3 种氨基酸可出现在任意位置; (b) 每种氨基酸只能在链中出现一次。

解: (a) 3 种氨基酸在三肽中的三个位置各有 3 种可能性, 即 $3 \times 3 \times 3 = 27$ (种)。(b) 每种氨基酸在链中只能出现一次, 那么, 第一位置有 3 个可能性, 第二个位置有 2 个可能性, 第三位置只有一个可能性, 即 $3 \times 2 \times 1 = 6$ (种)。

例: 一个分子量为 34000 的蛋白质含 12 种氨基酸, 假设每种氨基酸在该蛋白质分子中数目相等, 问这种蛋白质有多少种可能的排列顺序?

解: 求此种蛋白质中的残基数

$$\frac{34000}{110} \approx 309 \text{ (个)}$$

求 12 种氨基酸在 309 肽中平均出现的次数

$$\frac{309}{12} = 25 \text{ (次)}$$

如果 12 种氨基酸在 309 肽中平均出现 25 次, 可能有的排列顺序为

$$12^{25} \approx 10^{30}$$

例：20 种氨基酸能形成多少种六肽？假定六个不同部位中任一处用任意氨基酸。

解：可形成的六肽数为

$$20^6 = 6.4 \times 10^{27}$$

说明：20 种氨基酸在 6 个位置随机出现，等于说 20 种氨基酸在 6 肽中出现的几率均等。

10.1.4 序列测定

蛋白质和核酸一级结构测定是一项仍在发展中的技术，目前试题中检测的内容有：①学会使用各种蛋白酶、核酸酶的专一性；②理解重叠对比原理；③理解酶法、化学法测核酸序列原理；④会读写自显影后获得的胶片中的谱带。

例：从下列结果推导出这个简单多肽的顺序，并将多肽顺序用单字符表示出来。

- A. 酸水解得到 Ala_2 , Arg, Lys₂, Met, Phe, Ser₂
- B. 羧肽酶 A 酶解得到 Ala
- C. 胰蛋白酶酶解得到 Ala-Arg, Lys-Phe-Ser, Lys, Ala-Met-Ser
- D. 溴化氢水解得到 Ala-Arg, Ser-Phe-Lys-Lys-Met, Ala-Ser

解：从酸水解结果可知，此多肽为 9 肽。从羧肽酶 A 作用结果知，此 9 肽 C 端为 Ala。胰蛋白酶断裂 Arg 或 Lys 的 C 端的肽键，所以可知：Ala-Arg[↓]-Ser-Phe-Lys[↓]-Lys[↓]-Ser-Met-Ala。从溴化氢断裂可知，上述推知的结构中 C 端应调整为-Lys-Met-Ser-Ala。此 9 肽的顺序为：Ala-Arg-Ser-Phe-Lys-Lys-Met-Ser-Ala，用单字符表示为：A-R-S-F-K-K-M-S-A。

说明：这类题关键是要熟记各种专一性水解方法的专一性，重点放在胰蛋白酶、溴化氢和羧肽酶，其余的专一性不强。此例题的关键在于应用给出的结果，首先知道是几肽、N 端和 C 端各有什么残基，然后重点放在胰蛋白酶作用结果的分析。一般而言，推出的序列要能用提供的水解方法还原回去验证所得出的结果，例如此题根据胰蛋白酶作用结果对 C 端 Met 残基两侧的判断，如果不用溴化氢方法进行检验，得出的结果就会有误。

例：从如下数据推断多肽的氨基酸顺序

- a. 组成：Phe, Pro, Glu, Lys₂
- b. 用 Edman 试剂处理产生 PTH-Glu。
- c. 用胰蛋白酶、羧肽酶 A/B 酶解都不产生任何小肽或氨基酸。

解：由 a 知此多肽为 5 肽。由 b 知此多肽 N 端为 Glu。由 c 知不能被胰蛋白酶水解，但此肽中有 Lys，说明 Lys 的 C 侧端为 pro；不能被羧肽酶 A/B 水解，说明从 C 端起，第二个残基为 Pro；三种方法都无法切割此 5 肽，说明 Phe 在 Glu 和 Lys 之间，所以此 5 肽顺序为：Glu-Phe-Lys-Pro-Lys。

说明：此题是对两种羧肽酶和胰蛋白酶专一性应用的检测，两种羧肽酶虽然是从 C 端切割，但都对 C 末端残基 N 侧的残基有要求，共同特点是不能为 Pro。胰蛋白酶则有对其选择的残基 C 侧残基不能为 Pro 的要求。

例：tRNA 用 RNaseT₁ 限制降解得到一个长度为 13 个核苷酸的片段。该片段用 RNaseT₁ 完全降解得到的产物是：ApCpApGp, pGp, ApCpU, ApAp-UpApGp;用 RnaseI 完全降解得到的产物是：ApGpApApUp, pGpApCp, U, ApGpApCp。写出该片段的排列顺序。

解：从两种水解方法得到的结果可知，此片段为 13 个残基长，且为 A₆G₃C₂U₂，用重叠对比法得

```

ACAG
AGAAU
AAUAG
ACAG   AGAC
GAC           ACU
GACAGAAUAGACU
  
```

此题上述解法没有应用酶专一性位点知识，是在按重叠对比得出的，如果采用专一位点分析，同样可得出正确结果，但比较麻烦。

例：由下列加减法凝胶电泳图谱读出 DNA 的碱基顺序。

片段大小	+A	+G	+C	+T	-A	-G	-C	-T
25	—							—
22		—			—			
24			—			—		
23	—						—	
21				—	—			

解：按表中片段从小到大读，加法部分为 TACGA，减法部分为 TACGA。

说明：读减法部分时，要和加法相对照，并向前移一位，如第 22 在减法部分为 C，和加法对照后向前移一位使为 A。

例：用化学法处理后得到如下谱带，其 DNA 的顺序是什么？

A+G	G	C	C+T	解:
—	—			GGAGTTCCGG
—	—			GGAGTTCCG
		—	—	GGAGTTCC
		—	—	GGAGTTC
			—	GGAGTT
			—	GGAGT
—	—			GGAG
—				GGA
—	—			GG
—	—			G

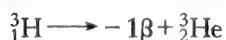
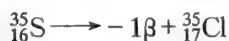
说明：如果未加说明，从下向上逐个写出顺序，因为片段越小，电泳时移动越多，在每一谱带的左端常为同位素/核素标记端，右端残基等于此谱带测定的残基，各谱带右端的残基从下向上读出的结果等于最上层的顺序。

10.1.5 同位素在生物化学与分子生物学中的应用

原子序数相同（即质子数相同）但质量不同（即中子数目不相同）的原子，称为某元素的同位素。同位素是质子数相同但中子数不同的原子之间的互称，不同元素同位素中每一种称为核素，由于习惯的原因，二者往往混用。

核素分为稳定性核素和放射性核素。生物学中常用的稳定性核素有 ^{13}C 、 ^{18}O 、 ^{15}N 、 ^{33}S 。稳定性核素测定常用质谱仪，或根据核素之间的质量差进行密度梯度离心，DNA半保留复制就是用这一方法证实的。

天然存在有60余种放射性核素，含量少，和生物学关系不大。人工核素约1000种，放射性核素的测量使用脉冲检测器。生物学中常用的放射性核素有5种： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{131}I 、 ^{34}S ，放射线均为 β 射线，即电子。上述5种核素的衰变反应为：



生物学中使用核素目的在于解决以下问题：①未知体积的测定，细胞内体积，生物体内体液总体积等不可能直接测定，采用放射性核素可以很方便地解决

这些问题；②物质浓度的测定，有些物质分离和纯化很费事，使用放射性核素可间接测定浓度；③物质在生物体内转变、分解、合成、转化，各种代谢抑制剂、活化剂作用的对象、机理，物质在细胞内的转运及各种转变的速度。

核素应用基础：衰变方程，比活性及单位。

衰变方程式：

$$\log N = -\frac{\lambda}{2.3}t + \log N_0$$

其中，N 为任一给定时间内存在的放射性原子总数目，即时间 t 后保留的部分。N₀ 为放射性原子的原始数目，λ 为单位时间放射性原子衰变数，每种核素各异。

由衰变方程可得到半衰期——放射性核素的数量衰变到原来一半数量所需的时间。

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{\lambda}$$

比活性为每单位数量物质中放射性数量，即放射性分子在总分子中所占的分数。

核素使用的强度单位有：居里 (Ci)，每秒钟有 3.7×10^{10} 个原子核发生衰变的任意放射性物质的数量；毫居里 (mCi) = 3.7×10^7 核衰变/秒；微居里 (μCi) = 3.7×10^4 核衰变/秒；贝克勒耳 (Bg)，每秒钟发生一次核衰变，1Ci = 3.7×10^{10} Bg，1Bg = 2.708×10^{-11} Ci。

因此，比活性的单位可有：Ci/g，mCi/g，μCi/g。放射性浓度单位（也可以用来表示比活性）有 Ci/ml，mCi/ml，μCi/ml。

由于测量衰变的仪器获得的数值小于理论值，因此每分钟衰变数 (DPM) 大于每分钟计数 (CPM)。DPM 和 CPM 也可用以表示比活性，1Ci = 2.22×10^{12} DPM，CPM = DPM × 计数率。

例：把放射性为 1950 CPM 的 Na₃³²PO₃ 0.05mg 加入某一含微量磷酸钠的样品中，混合均匀后提取分离，取一定数量的提取的磷酸钠测得比放射性为 660CPM/mg，求样品中磷酸钠的含量？

解：W₀ = 0.05mg，S₀ = 1950CPM/0.05mg = 39000CPM/mg，S₁ = 660CPM/mg，W_x = W₀ (S₀/S₁ - 1) = 0.05 × (39000/660 - 1) = 3.2 (mg)

说明：这是一种正稀释法，即将放射性物质加入非放射性物质中，计算公式中 W₀ = 加入的标记物数量，W_x = 原有的非标记物数量，S₀ = 加入的标记物放射性强度，S₁ = 混合后化合物的比放射性强度。

因为 S₀W₀ = S₁ (W₀ + W_x)，所以：W_x = W₀ (S₀/S₁ - 1)

例：用¹⁴CO₂ 使植物进行光合作用来获得放射性蛋白质。这种蛋白质水解分

离得到 153mg Glu, 其放射比强度为 254 脉冲 / (min·mg)。如果用 10.7mg 非放射性 Glu 加入到 126mg 放射性蛋白质中, 随后分离出的 Glu 含量为多少? Glu 在蛋白质中所占比率为多少?

解 1: $W_x = 10.7\text{mg}$, $S_0 = 254 \text{ 脉冲} / (\text{min} \cdot \text{mg})$, $S_1 = 191 \text{ 脉冲} / (\text{min} \cdot \text{mg})$,
 $W_0 = \frac{10.7 \times 191}{254 - 191} = 32.0 \text{ (mg)}$

解 2: $\frac{32.5}{126} \times 100 = 25.9\%$

说明: 这是一种反稀释法, 即将非标记的物质加入到标记的物质中, 计算公式同正稀释: $S_0 W_0 = S_1 (W_0 + W_x)$, $W_0 = \frac{W_x \times S_1}{S_0 - S_1}$

例: 精确地称取 3.4mg 纯蛋白水解酶 (有酯酶活性的), 用过量的二异丙基氟磷酸- ^{32}P (DF- ^{32}P) ($1\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) 处理。24 小时后加入 KOH 到溶液中, 使未反应的 DF- ^{32}P (极端有毒) 分解掉。用三氯醋酸沉淀标记的酶, 洗去游离的 ^{32}P , 然后重新溶解于 0.5mg 稀 KOH。定量转移 0.5ml 到闪烁计数管计数, 计数效率为 80% 时, 样品计数为 7380/小时。计算此酶的最小分子量是多少?

解: 24 小时后, ^{32}P 衰变使原加入量减少, $2.3 \log (S_0/S_1) = \lambda t$, $S_0 = 1\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, $t_{1/2} = 14.3$, $\log S_1 = \log 1 - 0.693 / (14.3 \times 2.3)$, $S_1 = (0.953 \text{ M Ci} / \text{mmol}) \times (2.22 \times 10^6 \mu\text{Ci} / \mu\text{Ci}) \times 0.80 = 1.693 \times 10^6 \text{ CPM} / \text{mmol} = 1.693 \times 10^9 \text{ CPM} / \text{mol}$ 。

标记酶中含

$$\frac{7380}{60} = 123 \text{ CPM } ^{32}\text{P}$$

$$\frac{123 \text{ CPM}}{16.93 \times 10^8 \text{ CPM} / \text{mol}} = 7.265 \times 10^{-8} \text{ mol } ^{32}\text{P}$$

按最小分子量计算方法有

$$\frac{7.265 \times 10^{-8} \text{ mol } ^{32}\text{P}}{3.4 \times 10^{-3} \text{ g}} = \frac{1 \text{ mol } ^{32}\text{P}}{\text{MW}}$$

$$\text{MW} = \frac{3.4 \times 10^{-3}}{7.265 \times 10^{-8}} = 46800$$

说明: 此题是用放射性核素同酶结合计算酶的最小分子量, 因为 DF- ^{32}P 同酶分子的丝氨酸残基在活性部位起反应, 该酶的最小分子量即含有 1 摩尔的活性丝氨酸残基的分子量, ^{32}P 结合到酶的摩尔数等于活性丝氨酸的摩尔数。

10.1.6 图表分析

这类题常见于酶的抑制作用曲线、遗传图和限制酶图谱、别构酶活力学曲线三种情况, 在同位素技术应用中也有出现。

例：实验获得如下数据，试分析：a. 抑制剂的类型；b. 在双倒数图中标示底物的 K_m 、抑制剂 K_i 、 V_{max} 。

[S] (mol/L)	无抑制剂 V (Vmol/min)	有抑制剂
1.0×10^{-4}	28	17
1.5×10^{-4}	36	23
2.0×10^{-4}	43	29
5.0×10^{-4}	65	50
7.5×10^{-4}	74	61

解：米氏公式为：

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

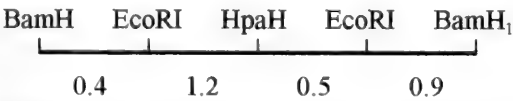
双倒数式为：

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

根据已知 [S]、V，计算出 $\frac{1}{[S]}$ 、 $\frac{1}{V}$ ，然后以 $\frac{1}{V}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图。两曲线在 y 轴交点不变， V_m 不变，说明抑制剂为竞争性抑制剂，两曲线在 x 轴截距为： $\frac{1}{K_m}$ ，
 $\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$ 。

作图和标示略。

例：从下面的限制图谱中分析：a. HpaII 切割后可获得的片段数目和大小；b. EcoRI 切割后可获得片段数目和大小；c. 这个片段总碱基数是多少？



解：已知限制图谱中：a. HpaII 的切点仅一个，可获得 1.6Kb、1.4Kb 两个片段；b. EcoRI 的切点有两个，可获得 0.9Kb、1.7Kb、0.4Kb 三个片段；c. 此片段总长为 0.4+1.2+0.5+0.9=3Kb。

生物化学与分子生物学中其他计算题如下：①最小分子量计算；②总蛋白质的计算（由含氮量）；③由渗透压，冰点等计算分子量；④由二级结构参数计算螺旋，折叠后长度，肽链长度；⑤ATP 生成数计算；⑥酶活力单位，比活力计算；⑦ΔG 的计算。

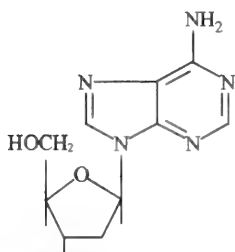
以上计算题因过于简单, 不再重复。

10.2 基础知识

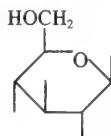
10.2.1 结构式的书写

例: 写出下列物质的结构式: ①dA; ② β -D-葡萄糖; ③L-Asp。

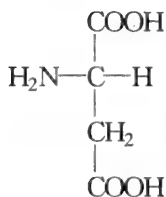
解: ①dA



② β -D-葡萄糖



③L-Asp



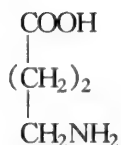
说明: 结构式问题在有机化学和生物化学考试中都会出现, 生物化学中 20 种氨基酸、5 种碱基和常见的单糖和有机酸结构式是必须要记忆的, 特别是构型、构象, 试题中常用英文字符来表示, 同时检查考生对这些符号的了解程度。

学习中要细心、耐心地理解并多练习, 许多学生总是回避这一问题, 结果在学习中无疑经常查阅, 造成很大被动。有些学生则认为这一问题太简单而忽视, 实际下笔写一写, 方知还是有一定困难的。

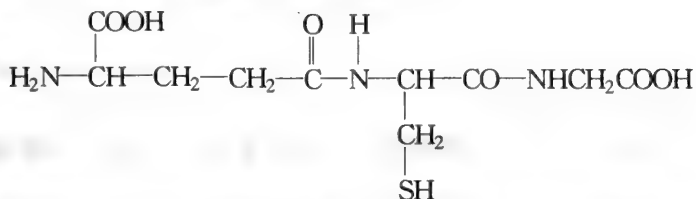
核酸片段、小肽及一些多糖、双糖经常用各组分的代号(中/英文)或名称缩写来表示, 要引起注意。

例: 写出下列物质的结构式: GABA、GSH。

解: GABA 的中文名称是 γ 氨基丁酸, 结构式为



GSH 的中文名称是谷胱甘肽，结构式为

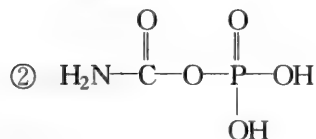
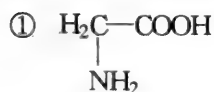


说明：用英文字母表示的物质名称中，有些并非按首字母、前几位字母等方法来表示，如 GABA 的全英文名称是 γ -aminobutyric acid。GSH 的英文全名是 γ -glutamylcysteinyl glycine。如果平时学习中能注意到缩写符号的来由，并对照结构式进行练习，考试时才不会将 GABA 误解为是 4 肽或核酸片段，而是将谷氨酸的 γ -羧基和半胱氨酸的 α -氨基结合起来写成肽键，将 $-\text{SH}$ 理解为巯基。

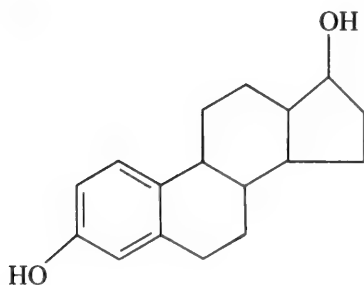
20 种氨基酸的英文单字符有 9 个不同于英文名称的首字母，如何现解和记忆已在蛋白质部分讲述。

10.2.2 辨认结构式

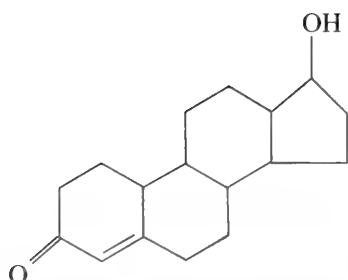
例：写出下列结构式的中文名称。



③



④

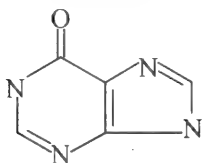


解：①甘氨酸；②氨基甲酰磷酸；③雌激素（雌二醇）；④雄激素（睾酮）。

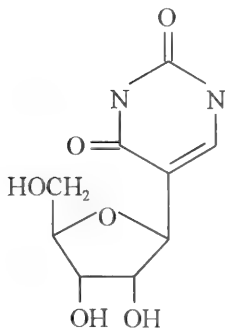
说明：生物化学和分子生物学中有一些结构式很复杂，不可能靠记忆来学习，考试中一般要求能区别和辨认即可，如雌、雄激素（除孕酮外），主要差别在于 A 环，前者为芳香环，后者仅有一个双键，平时学习要注意做到这一点。有些结构式看似简单，用有机化学命名方法可以写出名称，这样做当然是正确的，但还是要联系俗名，以防对号划线时出错。

例：写出下列结构式的英文代号。

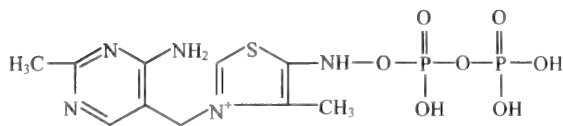
①



②



③



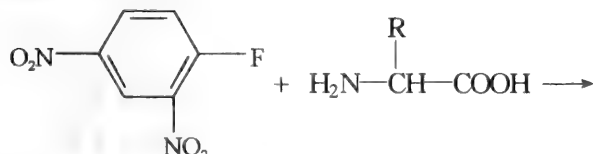
解：①I；②ψ；③TPP

说明：有些物质的英文代号很特殊，如用 ψ 表示假尿苷，不同于尿苷之处在于 ψ 中的核糖和碱基是 1'-5 相连，正常尿苷为 1'-1 相连。维生素和辅酶的结构式大多数是不同的， B_1 的辅酶是 TPP。

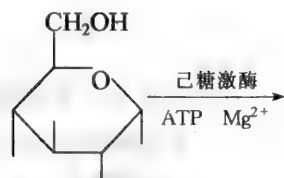
10.2.3 化学反应式

例：完成下列反应式。

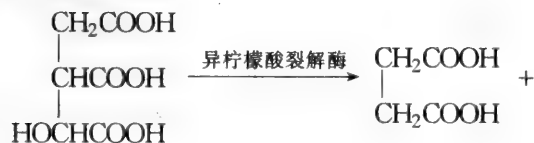
①



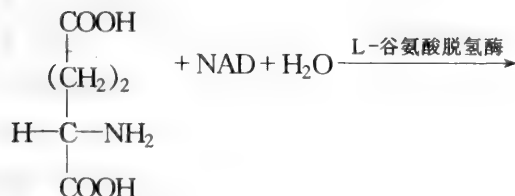
②



③

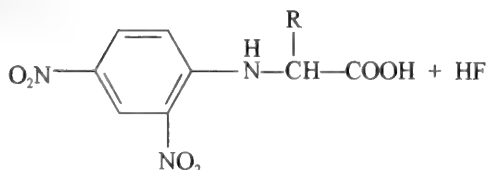


④

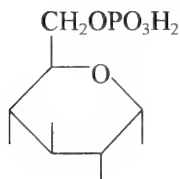


解：

①



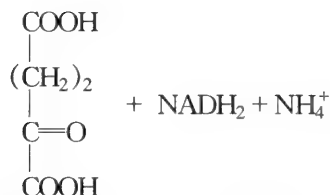
②



③



④



说明：完成反应式型试题，目的在于检查学生对各种代谢途径的理解程度，如重要的酶、重要的产物、关键反应等。每一个代谢途径可能有数步反应，但有代表性的、在调节过程中起关键作用的反应只有少数几个，如乙醛酸循环不同于三羧酸循环之处仅为③反应。只有在学习中反复对照分析，对每个代谢途径的调节有深入了解，才能悟出哪些是关键酶和关键反应。

10.2.4 基本事实（一句话，什么是什）

生物化学与分子生物学特点之一是知识增加速度快，初学起来显得很多，很零碎，另一特点是有许多问题一直没有最终答案，多种解释并存，初学者无所适应，在这种情况下，首先将已经充分肯定、无需进一步证实的知识要学习好。填空、选择、是非题往往出自这些内容。试想一个选择题，如果还没有定论，何谈什么选择的准确性呢？另外，填空题、选择题和是非题是检查学生对一门课程基本内容掌握全面与否的好方法，一组选择题，可以包括全书各部分内容，学生疏乎了的学习内容，很容易被发现。为了让大家快速、准确、全面掌握这些基本知识，适应选择、填空、是非题考试，用“一句话”方式将最基本的知识、事实罗列如下：

1. 生物体中最主要的己糖是 β -D-葡萄糖。
2. 淀粉、糖原中的葡萄糖为 α -D 葡萄糖。
3. 纤维素分子中的糖苷键为 β (1 \rightarrow 4) 糖苷键。

4. 蔗糖分子中的糖苷键为 α, β (1 \rightarrow 2) 糖苷键。
5. 核酸分子中的核糖为 β -D 核糖。
6. 生物体中的脂肪酸绝大多数是偶数碳原子脂肪酸。
7. 哺乳动物不能合成亚油酸和亚麻酸。
8. 磷脂的磷酸基及胆碱亲水，其余的部分亲脂。
9. 蛋白质生物合成直接需要 20 种氨基酸。
10. 除甘氨酸外，其余 19 种编码氨基酸有旋光活性，均为 L-型氨基酸。
11. 两羧基-氨基的氨基酸等电点偏酸。
12. 目前蛋白质测序的主要原理是 Edman 反应。
13. 强酸水解蛋白质时色氨酸被破坏。
14. 目前氨基酸定量分析原理是茚三酮反应。
15. 氨基酸分离常采用阳离子交换层析。
16. 蛋白质空间结构在表现其生物功能时可变。
17. α 螺旋、 β 折叠结构模型是由美国科学家 Pauling 等提出来的。
18. 人体不能合成 8 种氨基酸 (Thr, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Lys, Met)。
19. 锁链素是由 4 个 Lys 缩合而成的。
20. 蛋白质的最大吸收峰在 280nm 处，这是由芳香族氨基酸引起的。
21. 消化液中的蛋白酶主要作用于必需氨基酸形成的肽键。
22. 目前的蛋白质测序技术主要是从 N 端进行的。
23. α -角蛋白的超二级结构为“三右 \rightarrow 左”式；胶原蛋白是“三左 \rightarrow 右”式结构。
24. 球状蛋白中亲水氨基酸常在外侧，疏水氨基酸常在中心。
25. 蛋白质变性是空间结构受异常因素影响而改变，同时生物学功能丧失。
26. 结构域有空间和一级结构域两类。
27. 蛋白质、核酸的主干链单调重复，前者为“-C-C-N”，后者为“核糖-磷酸”
28. 蛋白质一级结构化学键主指肽键和二硫键。
29. 氢键既存在于蛋白质、核酸的空间结构，又是核酸转录、翻译中碱基配对的化学键。
30. 免疫球蛋白是一类血浆糖蛋白，种类极多。
31. 蛋白质分离、纯化主要是利用蛋白质分子的净电荷、分子大小和形状、溶解性和亲合力的不同。
32. 自然界蛋白质中氮含量一般为 16%。
33. 一个斯维德贝格单位 (S) 等于 10^{-13} 秒。

34. 沉降速度法使用的速度大于沉降平衡法, 前者利用了不同的离心速度进行, 后者是利用了离心力和扩散力的平衡。

35. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率主要与分子量有关, 与所带电荷和分子形状无关。

36. 在凝胶过滤法中, 分子大于凝胶网孔的先被洗脱, 小分子后被洗脱。

37. 离子交换是同种电荷离子之间的交换, 阳离子交换树脂和阳离子进行交换。

38. 蛋白质生物合成是从 N 端向 C 端进行的。

39. 原核生物蛋白质生物合成第一个加入的氨基酸为 fMet。

40. mRNA 中的密码子和 tRNA 分子中的反密码子是反平行配对的。

41. 原核生物基因是多顺反子结构, 真核生物是单顺反子结构。

42. 真核生物基因往往是不连续的。

43. 真核生物已合成肽链之间可以重组加工, 这是一种编辑过程。

44. 蛋白质、核酸的种类差异在于 R 基和碱基的排序不同、长度不同。

45. mRNA 被翻译的方向是 $5' \rightarrow 3'$ 。

46. 酶的本质不仅是蛋白质, 某些 RNA 也有酶活性。

47. 本质为蛋白质的酶的活性中心常出现的残基有 Asp、Thr、Ser、Glu 等。

48. 激酶在酶的系统分类中属于合成酶类。

49. 酶的纯度不直接用含量而用比活力表示。

50. 米氏常数是酶的特征常数, 其单位为浓度单位, 等于反应的速度达到最大反应速度一半时的底物浓度。

51. 竞争性抑制剂和底物结构有类似性, 能和正常底物竞争结合酶的同一部位, 所以 K_m 增大, 但 V_{max} 不变。

52. 辅酶或辅基决定酶的反应性质, 酶蛋白决定酶的专一性。

53. 人类获得的第一个结晶酶是脲酶。

54. 负反馈方式调节是生物实现自稳态的基本调节方式。

55. 别构酶的速度-底物关系曲线不一定均呈 S 形曲线。

56. 核糖体是肽、蛋白质生物合成的主要场所。

57. 肽链延长所需的能量由 GTP 直接供给。

58. 合成的蛋白质外分泌有信号肽参加, 细胞内转移有导肽参加作用。

59. ΔG° 为正的反应在生物体中可以进行。

60. 抗菌增效剂 (TMP) 结构与二氢叶酸类似, 是细菌二氢叶酸还原酶的强烈抑制剂。

61. 某些 RNA 具有酶活性。

62. 遗传信息主要编码在 DNA 中, 但 RNA 也编码遗传信息。

63. 碱基互补配对是生物中心法则的核心，是双螺旋结构学说的精髓。
64. DNA 和 RNA 的组成差异在于前者为脱氧核糖，且以 T 代替了 U。
65. DNA 常以双链形式存在；RNA 以单链为主，可部分回折成双链。
66. 原核生物 DNA 是裸露的；真核生物 DNA 是同蛋白质结合在一起的。
67. 分离 RNA 常用蔗糖梯度离心；分离 DNA 常用氯化铯密度梯度离心。
68. 内含子一般不被翻译，但在转录后的加工中及 DNA 分子内有多种作用。
69. DNA 双螺旋结构是由 Watson 和 Crick 提出的，查格夫规则是这一学说的主要依据之一。
70. X 射线衍射是揭示蛋白质，核酸二级结构最成功的方法。
71. 左旋 DNA 是由 Rich 提出的，Z-DNA 有大沟、小沟之别，呈左旋。
72. 核酸的最大光吸收峰为 260nm，核酸定量分析常用紫外吸收法。
73. 嘌呤核苷正常糖苷键为 1'-9，嘧啶核苷为 1'-1。
74. 自然界核酸合成所需的核苷酸为 5'-核苷酸。
75. DNA 中 G、C 含量和 T_m 成正比。
76. G/C 在 DNA 分子分布不均匀是形成卫星 DNA 的根本原因。
77. 来源不同的 DNA 链之间的复性叫 DNA 杂交。
78. 不同来源的 DNA 片段的组合叫 DNA 重组。
79. 限制性内切酶作用于双链 DNA 内部，识别位点在双链，长度为 4~8 碱基对。
80. 限制性内切酶是 1979 年由 Arber、Smith 等人发现的，这是 DNA 重组技术诞生的标志。
81. 核苷酸分解不提供能量，核酸合成不另供给能量。
82. 嘌呤、嘧啶碱基是氨基酸代谢的产物。
83. 嘌呤环在动物体内代谢时不打开。
84. 嘌呤环生物合成是先右环后左环。
85. 生物体内脱氧核苷酸是由二核苷酸还原而来的。
86. 生物体内 dTMP 是由 dUmp 甲基化而来的。
87. 稀有碱基、核苷主要见于 RNA，特别是 tRNA。
88. DNA 半保留复制首先是由 ^{15}N 标记培养和密度梯度离心技术证实的。
89. 大肠杆菌 RNA 合成酶仅发现一种。
90. 原核生物 DNA 聚合酶有三种，DNA 聚合酶 III 且是主要的 DNA 复制酶。
91. 核酸生物合成的方向是 5'→3'。
92. 原核生物 tRNA、rRNA 是同时被转录的。
93. 反转录是以 RNA 为模板合成 DNA 的过程。

94. 真核生物 DNA 中的 DNA 片段可以双向移动。
95. 研究 DNA 复制常以³H 脱氧胸苷做标记。
96. 原核生物 DNA 复制是单起点；真核生物线粒体和叶绿体 DNA 复制是单起点。
97. 真核生物 DNA 复制是多起点，每个起点的作用速度小于原核生物，但总速度大于原核生物。
98. 转录是 DNA 的部分转录。
99. DNA 复制需要 RNA 聚合酶催化 RNA 引物合成。
100. α -鹅膏蕈碱抑制真核生物 RNA 聚合酶作用。
101. 大肠杆菌 DNA 的转录起点的 -10 处保守顺序为 TATAA，称为 Pribnow 框，是与解开 DNA 双链有关的结合 RNA 聚合酶的序列。
102. 原核生物 -35 序列是 γ 亚基的识别位点。
103. 乳糖操纵子的启动子有 cAMP-CAP 复合物结合位点。
104. 原核生物转录终止子呈发夹或茎环结构。
105. 原核生物的启动子在原核细胞中可以重组使用，用于表达真、原核生物基因。
106. 真核生物基因家族以多拷贝形式存在。
107. 真核生物三种 RNA 聚合酶的启动子互不相同。
108. 真核生物转录启动子有基因内、外启动子之别，一个转录单位的启动子可以不止一个。
109. 操纵子模型是由法国 Monod 和 Jacob 于 1961 年提出的。
110. 真核生物和病毒的基因组中有对转录起增强作用的 DNA 序列——增强子。原核生物尚未发现增强子。
111. 原核生物 rRNA 有 23S、16S、5S 三种。
112. 真核生物 rRNA 有 28S、18S、5S 三种。
113. cAMP、IP₃、DG、Ca²⁺、cGMP 是已知的几种第二信使。
114. 真核生物 mRNA 的初级转录产物是 hnRNA。
115. RNA 是可以复制的。
116. 嘌呤和嘧啶类的类似物可以是正常嘌呤和嘧啶的竞争性物质，可以掺入到核酸分子中。
117. 烷化剂如氮芥可使碱基烷基化。
118. 吖啶类染料可以插入 DNA 相邻碱基之间。
119. 利福平抑制细菌 RNA 聚合酶活性。
120. 核糖体是肽和蛋白质生物合成的场所，但不是惟一场所。
121. 氨基酸有 61 组密码子，终止密码子有 3 个。

122. 遗传密码是 Nirenberg 等于 1965 年正式提出的。
123. 遗传密码子的第三位碱基可变性较大。
124. 线粒体、叶绿体的遗传密码和通用密码有差异。
125. 原核生物 DNA 复制的起点与细胞核相结合，真核生物 DNA 复制在核膜上开始。
126. 白喉毒素和延长因子 II (EF₂) 结合。
127. 氯霉素、四环素、链霉素与核糖体结合抑制原核生物 DNA 翻译，亚胺环己酮只抑制真核细胞的翻译。
128. 蛋白质糖基化是在内质网中进行的。
129. 6-磷酸甘露糖酯指挥糖蛋白的运输方向。
130. mRNA 的概念是由 Jacob 和 Monod 提出的。
131. 研究中间代谢最有效和最常用的方法是同位素示踪法。
132. 苯环在人体中不能合成也不能被打开，在代谢研究中成为最早的标记物。
133. ATP 是各种高能磷酸化合物的中间体。
134. 已知的离子跨膜运输主要有离子泵、离子通道和离子载体三种方式。
135. 电子是从氧化—还原电势偏负或低的一侧向偏正或高的一侧移动的。
136. 线粒体是生物氧化的场所。
137. 鱼藤酮、安密妥和杀粉蝶菌素阻断电子由 NADH + H⁺ 向 CoQ 传递。
138. 抗霉素 A 抑制电子从 Cyt_b 到 CytC₁ 传递。
139. 氰化物、硫化氢、一氧化碳等抑制电子由 Cytaa₃ 到 O₂ 的传递。
140. 2, 4-一二硝基苯酚抑制 ATP 的合成，寡霉素、缬氨霉素、短杆菌肽等有同样作用。
141. 葡萄糖激酶不受 G-6-P 负反馈抑制。
142. 砷酸盐是 H₃PO₄ 的竞争性物质。
143. 糖酵解的三个关键酶是己糖激酶、二磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶。
144. 乳酸脱氢酶是同工酶。同工酶之间结构不同，催化的反应相同，对反应两侧物质亲合力不同。
145. 糖酵解、磷酸戊糖途径是在细胞质中进行的。
146. UDPG、ADPG 是多糖合成时葡萄糖活化的主要方式，二核苷酸化是糖的合成代谢中单糖活化的主要方式。
147. 磷酸果糖激酶是一种双功能酶或曰前后酶，磷酸化和脱磷酸化后具有两种酶活性。
148. 糖异生是克服糖酵解三个关键酶催化的不可逆反应的途径，主要由两种磷酸酯酶和一种羧化酶催化。

149. 三羧酸循环是糖、脂、蛋白质彻底分解的共同途径。
150. 三羧酸循环中异柠檬酸第一次脱羧的碳原子不是直接来自新加入的两个碳原子。
151. 一分子葡萄糖经糖酵解可净获得 6ATP。
152. 三羧酸循环一周可净获得 12ATP。
153. 一分子葡萄糖有氧分解可净获得 36 (38) 分子 ATP。
154. 糖分解时单糖活化以磷酸化为主, 其次是酰基化 (活性醋酸)。
155. 维生素 B₁ 辅酶是丙酮酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶和转酮酶的组分, 是与糖代谢关系最密切的维生素辅酶。
156. 氧化磷酸化有底物水平、电子传递式两类, 电子传递式又有光合磷酸化和线粒体中的电子传递氧化磷酸化两种。
157. 三碳循环的 CO₂ 受体是 1, 5-二磷酸核酮糖。
158. Rubisco 酶有羧化和加氧两种能力。
159. 四碳途径 CO₂ 的受体是磷酸烯醇式丙酮酸。
160. 光反应的产物首先是 ATP 和 NADPH + H⁺
161. 脂肪酸 β -氧化每次脱去两个碳原子。
162. 脂肪酸活化以脂酰 CoA 形式为主。
163. 真核生物脂肪酸合成酶二条链上不同的结构域有不同的酶活性。
164. 脂肪酸生物合成延长途径在线粒体中进行时以乙酰 CoA 为二碳供体, 在内质网中以丙二酸单酰 CoA 为二碳供体。
165. 脂肪生物合成从甘油和脂肪酸起步时双方都需活化, 前者磷酸化, 后者酰基化。
166. 磷脂生物合成各组分以二核苷酸化为主要活化方式, 卵磷脂合成首先活化乙醇胺 (CDP-乙醇胺) 或直接活化胆碱 (CDP-胆碱), 磷脂酰丝氨酸合成首先活化甘油二酯 (CDP-甘油二酯)。
167. 胆固醇是胆酸、性激素、维生素 D 等生物合成的前体。
168. 萜类化合物生物合成的起始物为乙酰 CoA。
169. 脂类物质生物合成的起始物为乙酰 CoA。
170. 萜类、甾体类物质生物合成的共同中间物为异戊二烯焦磷酸。
171. 雌、雄激素的结构差异主要在 A 环上, 雌激素 (孕酮的外) 的 A 环为芳香环。
172. 前列腺素、白三烯等是由花生四烯酸转变而来的。
173. L-谷氨酸脱氢酶是生物体内分布最广、活性最强的氨基酸氧化脱氢酶。
174. 生物氨的排泄方式有尿素、尿酸、氨、酰胺、鸟嘌呤和氧化三甲胺等。

175. 一碳单位的载体主要是 FH_4 。
176. 一碳单位来自 Gly、Thr、Ser、His 和 Met 等。
177. 黑色素是酪氨酸转化的产物之一。
178. 磷酸肌酸是由 Arg、Gly 和 Met 合成的。
179. L-Lys 的合成起始物有 L-Asp 和 α -酮戊二酸两种，由前者合成的途径见于细菌和植物，后者见于蕈类和眼虫。
180. 植物芳香族氨基酸是由莽草酸途径合成的，起始物质为 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸。
181. 组氨酸生物合成和嘌呤、嘧啶核苷酸、色氨酸合成一样需要 PRPP。
182. 卟啉是由 Gly 和琥珀酰 CoA 及 Fe^{2+} 合成的。
183. D-氨基酸大多是由 L-氨基酸变旋而来的。
184. 生物固氮是一个还原过程。
185. 核酸中的核糖为 β 型，但合成时所需的为 α 型。
186. 磺胺药是细菌叶酸合成的竞争性抑制物。
187. DNA 的半保留复制是 1958 年由 Meselson 和 Stahl 首先证明的。
188. DNA 复制是半保留式，转录是全保留式进行的。
189. 环状 DNA 复制是单起点，大多为双向复制。
190. 滚动环、D 环复制是用来解释环状 DNA 复制的。
191. DNA 生物合成的底物为四种 dNTP。
192. 大肠杆菌 DNA 聚合酶是单链的，含有锌，同时具有合成和水解多种功能。
193. 除高等哺乳动物外，其他生物具有 DNA 光修复能力。
194. SOS 修复是一种诱导修复，修复基因的表达受调控。
195. 反转录酶是由 Temin 等于 1970 年发现的。
196. 代谢调解有酶、激素和神经三个水平。酶的调节主要是基因表达调节。基因表达调节是最根本的代谢调节。
197. 磷酸化-脱磷酸化是各种调节水平共有的调节机理。
198. 类固醇激素的受体在细胞质中。
199. 经载体进入表达细胞的目的基因和表达系统细胞的基因组一般情况下是相互独立存在的。
200. 独立存在于表达细胞中的重组基因表达至少需要启动子、终止子、调节基因、操纵基因，能够独立复制和转录。
201. 真核细胞的启动子不能被细菌 RNA 聚合酶识别。
202. 真核细胞 mRNA 的 SD 序列不能与细菌核糖体结合。
203. DNA 的 T_m 值一般在 $70\sim 85^\circ\text{C}$ 之间。

204. 真核生物基因组的 Cot 曲线是多 S 曲线。

205. 单克隆抗体是从单个无性繁殖系的细胞得到的抗体。

对于参加研究生考试的学生,一般而言,已经对生物化学和分子生物学有了初步的了解,在十余年的辅导中认识到,大多数考生对于试卷内容的基本知识都能回答上来,但对试卷中的有些试题往往有两种情况出现:一是根本就没有遇到过这些内容,学习和复习中没有注意到,或者是自己所使用的教材没有这些内容,产生这种现象的原因无非是学习中不仔细,看书不认真、不全面,人为漏阅了这些内容,或者学习中不深入,阅读的教材太单一;二是知道一些,但很肤浅,没有真正搞懂,产生这种现象的原因是考生自己划重点,对自认为简单的内容走马观花。为了解决这些问题,用 205 句话的方式将生物化学和分子生物学各方面,各层次的基本和重要的事实罗列出来,促使带动学生在书中查对,从而对大纲内容有全面和深入的学习。但必须明确,这 205 句话不是用来死记硬背,如果不理解这些事实,死记硬背也很难奏效,这些基本事实是结论性的,不可能一下子都理解,毕竟复习时间有限,但首先解决是否知道,然后逐步走向理解是很有必要的。

10.2.5 基本概念(什么叫什么)

生物化学与分子生物学中的许多知识最终形成成为一种概念或名词。由于大多数名词是翻译而来的,翻译的结果往往产生了同一外文单词或词组而有多个中文名称,只有等到一个新名词经反复争论后由权威机构统一起来,人们才能用一个名词来表示,为了防止误解,考试题中常用英文和中文同时出题,学习中应当重在理解本质,看懂其所指的内容究竟是什么,例如“内含子”这一概念,至今仍有多种叫法,但只要知道它是指真核生物基因组中插入的不直接编码蛋白质的、在 mRNA 加工中要切除的 DNA 序列才是最为重要的。

由于概念很多,仅选择了多年来各校试题中常出现的一些概念,答案仅提供要点,经常要求进行区别的同时列出。由于同一概念的解释和翻译有些差异,下面的解释仅供参考,学习中要仔细阅读教材,经常参阅国家统一公布的标准,同时熟悉英文单词。对于那些最基本的概念,仅仅列出而不做解答,以节省篇幅。

一、糖和脂

1. 构型与构象 σ 键旋转,构象改变,构型不变;共价键断裂,构型改变。

2. 旋光异构 这仍是一种构型异构,分子中有手性碳原子。

3. 酯、脂肪、脂类、类脂 醇酸以酯键结合成酯,脂肪为甘油三酯,脂类包括甘油三酯、磷脂及胆固醇等,因溶解性相同,磷脂、胆固醇等又叫类脂。

4. 糖蛋白与蛋白聚糖 总称为结合糖或复合糖。糖蛋白是由多肽链结合许多杂糖链而形成的, 而蛋白聚糖是由不分枝的糖胺聚糖链为中心与若干肽链结合而成的, 前者以蛋白质为主, 后者以糖为主。

二、蛋白质和核酸

1. 一级结构 指蛋白质中氨基酸和核酸中核苷酸的排列顺序, 又叫初级结构、平面结构、化学结构。

2. 空间结构 即构象, 包括二级结构、三级结构、四级结构、超二级结构。

3. 兼性离子与等电点 同一分子带两种电荷, 又叫偶极离子, 净电荷为零时, 同一种分子所带正、负电荷数相等, 此时的 pH 叫 pI。

4. DNP 反应 即 2, 4-二硝基氟苯与氨基酸的反应, Sanger 最早用于测定 N 端和测序。

5. Edman 反应 即苯异硫氰酸酯反应, 苯异硫氰酸酯不仅可以和 N 端残基结合, 而且可切下此氨基酸残基后不影响其余肽部分。

6. 活性肽 有特殊生理功能的小肽, 如脑啡肽。

7. 离子交换层析 用离子交换树脂做支持物的层析, 离子交换树脂有阴、阳离子交换树脂两类, 可对带静电荷的分子进行交换吸附和分离。

8. HPLC 高压液相色谱的简称, 使用颗粒极细的支持剂, 在高压下使液体混合物得以分离。

9. 两面角 (Φ 和 Ψ) 在肽平面中 $C_\alpha-N_1$ 和 $C_\alpha-C_2$ 单键旋转的角度, 所有已知的蛋白质二级结构可以用两面角描述并模拟出来。

10. Ramachandran 图 简称拉氏图, 是用 Φ 角对 Ψ 角做出的图, 所有的蛋白质二级结构均在此图上可以找到分布位置。

11. 超二级结构 二级结构单元的组合物, 如 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 等。

12. 结构域 分为空间结构域和平面或一级结构域, 一般而言是指前者, 这是蛋白质三级结构中的相对独立的三维实体, 是在超二级结构基础上组装而来的, 如丙酮酸激酶的 β -圆桶。一级结构域是指相对保守和独立的一段序列, 往往形成特定的二级结构。

13. Hill 曲线 肌红蛋白的氧合平衡方程线性化后 $\log \frac{Y}{1-Y}$ 对 $\log P_{O_2}$ 作图所得的直线, 此直线的斜率叫 Hill 系数, 血红蛋白的 Hill 曲线不是一条直线。

14. 斯笃克半径 在凝胶过滤实验中, 被分离的物质具有和某一理想的非水化球体 (如标准蛋白) 具有相同的洗脱体积时, 则认为此物质与该球体具有相同的半径, 称之为斯笃克半径。

15. 外水体积 又叫外体积、孔隙体积, 是凝胶颗粒之间的体积。

16. 迁移率(泳动度)(μ) $\mu = \frac{\text{泳动速度 } V \text{ (cm/s)}}{\text{电场强度 } E \text{ (伏特/cm)}}$, 表示单位时间单位电场强度下颗粒在电场下移动的速度。

17. 查格夫(Chargaff)规则 即 DNA 的碱基组成中 $A = T$, $G \equiv C$ 配对的规律, 这是双螺旋结构学说的基础之一。

18. 拓扑异构 首先在环形 DNA 中发现, 同一组成的 DNA 不同时期两链之间具有不同的缠绕次数(L), 这是由 DNA 超螺旋的方向不同引起的。

19. 增减色效应 在 DNA 分子变性和复性时紫外吸收值呈现相应增加和减少的现象, 广泛用于分子杂交实验。

20. T_m DNA 双螺旋结构变性(两链分开)一半时的温度。

21. 印迹法 在各种膜上进行的分子杂交和亲合技术, 有 Southern 印迹、Northern 印迹、Western 印迹三种, 第一种用于 DNA-DNA 在硝酸纤维素膜上的杂交, 第二种用于 RNA 杂交, 第三种用于蛋白质亲合分析, 在膜上进行杂交和亲合分析有利于选择分离及分析。

22. 限制酶图谱 同一 DNA 用不同的限制酶进行切割从而获得各种限制酶的切割位点, 由此建立的位点图谱有助于对 DNA 的结构进行分析。

23. 遗传图谱 用遗传学方法对 DNA 进行基因定位, 确立 DNA 分子中各基因的位点、长度等。

24. 11-顺视黄醛 视蛋白的组分之一, 来自 V_A , 光明亮时为顺式结构, 光暗时为反式结构, 与一般物质多为反式不同。

25. G 蛋白 依赖于 GTP 的蛋白质, 有多种, 膜受体成分之一, 传导多种信号给腺苷酸环化酶等。G 蛋白为异源三聚体, α 亚基多变, 是 G 蛋白发挥信号传导作用的主体。

26. CaM 钙调蛋白, 结合钙蛋白质的一种, 牛脑的 CaM 由 148 残基组成。CaM 有结合 Ca^{2+} 的结构域, 此结构域内有 EF 结构, CaM 与十余种生理活动有关, 可以活化其他的酶, 影响细胞内 Ca^{2+} 浓度。

27. 高能化合物 生物学中因某个化学键断裂而释能较多的物质, 如 $ATP \rightarrow ADP$, 此概念和纯化学高能键的意思相反。

28. 摩尔光量子 等于 6.02×10^{23} 个光量子, 一个摩尔光量子又叫一个爱因斯坦光量子, 不同波长的光的光量子具有的能量不同。

29. 脂蛋白与载脂蛋白 脂蛋白由载脂蛋白和所携带的脂类结合而成, 主要有 6 种, 载脂蛋白主要有 7 种, 主要担负携带脂类运输的作用。

30. 溶血磷脂 磷脂分子失去一个脂肪酸后剩余的部分, 因有溶血作用而得名。

31. 氧化脱氨基 伴随着氨基酸脱氢而进行的脱氨基作用, 由氨基酸氧化

酶催化。

32. 联合脱氨基 有转氨酶和氨基酸氧化酶共同催化的反应和嘌呤核苷酸循环反应两种类型。后者见于骨骼肌、心肌、肝和脑。

33. DNA 半保留复制 DNA 复制的方式，以原有 DNA 双链为模板各合成一条新链，新链和旧链各组成子代 DNA 分子。

34. 不连续复制 DNA 复制时新链分段合成后再连成一条完整的新链。

35. DNA 聚合酶 以 DNA 为模板合成 DNA 的酶。真核生物、原核生物有自己的 DNA 聚合酶。大肠杆菌有 3 种，每一种有聚合、外切等多种作用。真核生物有 4 种此类酶，都不具备外切能力。

36. 拓扑异构酶 催化 DNA 分子双链产生不同缠绕数的酶，有两种类型，I 型可清除负超螺旋，II 型可增加负超螺旋。

37. 重组修复 复制后修复的主要方式，主要由重组基因 A、B、C 编码的酶及其他酶共同完成。

38. 转录与反转录 以 DNA 为模板合成 RNA 叫转录，以 RNA 为模板合成 DNA 叫反转录。转录是全保留和分段进行的，转录和反转录是遗传信息传递的过程。

39. RNA 聚合酶 以 DNA 为模板合成 RNA 的酶，底物为 4 种 NTP，原核生物此酶有一种，真核生物有三种，聚合的方向均为 $5' \rightarrow 3'$ 。

40. 启动子 DNA 被转录时，RNA 聚合酶结合、识别和开始转录的 DNA 序列，如原核生物的 -35 序列和 -10 序列。

41. 衰减子 DNA 分子中的调控序列，首先发现在细菌色氨酸操纵子中，此类序列具有使转录终止的作用，受所控制基因表达产物的调控。

42. 增强子 DNA 分子中的调控序列，发现于真核生物和病毒，远距离作用于同一条 DNA 的启动子，对转录起增强作用。

43. 操纵子 发现于原核生物，相关结构基因同受一个启动子、操纵基因和调节基因控制，相关结构基因、启动子和操纵基因叫做操纵子。一般不将调解基因列入操纵子之内。

44. 校正基因与 tRNA 突变 DNA 分子碱基变化导致某个氨基酸密码子改变，DNA 分子中编码这种氨基酸 tRNA 的基因也发生突变，产生的 tRNA 携带的正常氨基酸仍能在已突变的密码子上对号入座，编码这种突变 tRNA 的基因就是一种校正基因，tRNA 基因的突变可以校正结构基因的突变。

45. 分子伴侣 协助肽链折叠成蛋白质的蛋白质或酶，如 HSP 等。分子伴侣同时具有其他一些作用。

46. 蛋白质编辑 多肽链合成后肽片段经重新组合后形成蛋白质的过程。

47. 氨酰 tRNA 合成酶 催化 tRNA 和氨基酸结合的酶，此酶对氨基酸的

种类、构型都有选择性。

48. 负反馈 一种作用的结果对这种作用的抑制，如某反应的产物对催化这一反应的酶的抑制。

49. 前馈 输入对输出的影响。

50. DNA 重组载体 简称载体，携带外源 DNA 进入宿主细胞并能正常表达的运载工具。

51. 穿梭质粒 在真核和原核细胞中都能复制的质粒，此类质粒有真核生物和原核生物两类复制起点。

52. 菌落原位杂交 是原位杂交的一种，将 DNA 或 RNA 分子转移并吸附固定在薄膜后进行杂交叫原位杂交，如果被转移的分子改用菌落直接转移，即菌落原位杂交。

53. 插入失活 外源 DNA 插入到载体的某个基因中间而使得这一基因作用丧失，由此带来一种标志或信息，表明外源 DNA 重组成功。

54. Ti 质粒 土壤农杆菌感染植物时，其质粒 Ti 质粒携带的外源基因使植物产生肿瘤（冠瘿），Ti 质粒用做植物 DNA 重组载体。

55. 基因文库 将一种生物基因组储存在可以长期保存的重组体中。

56. cDNA 文库 由 mRNA 和基因组的 RNA 获得的互补 DNA 建立的基因文库（cDNA 有互补和环形 DNA 两种解释）

57. Klenow 片段 即大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段，仅保留了 5'→3' 聚合和 3'→5' 外切的能力。

58. 分子克隆 克隆（clone）是无性繁殖的意思，如用 DNA 重组技术将目的基因扩增即是 DNA 克隆。

59. 表达系统与宿主细胞 在 DNA 重组中，外源 DNA 经重组后进入另外的细胞中表达，这样的细胞即是一个表达系统，也是宿主，但单纯的病毒入侵而进入的细胞不一定能有所需的表达系统。重组 DNA 的表达系统有真核细胞和原核细胞两类。

60. 细胞凋亡 主动清除无用或有害细胞的过程，此过程由多种基因参与，如 ICE 基因、Ced 基因等。

61. 体细胞克隆 即体细胞无性繁殖。正常情况下已经分化的体细胞的再分化能力基本丧失，但由于体细胞的 DNA 序列结构并没有改变，只要改变体细胞的生存条件，分化能力仍可恢复，通过核移植或加入适当的物质已经可以做到这一点。

62. 多肽因子 又叫细胞因子、生长因子、免疫因子等。这是一类化学本质为多肽的非内分泌腺合成的主要通过体液扩散的调节物质。多肽因子没有靶细胞但有膜受体。多肽因子的作用主要与调节免疫系统、神经系统、造血系统有

关。

63. 单克隆抗体 简称单抗。是通过单一抗原刺激后的免疫细胞和具有很强的增殖能力的肿瘤细胞杂交获得杂交瘤细胞，从在体外极易增殖的杂交瘤细胞中可以分离出高含量单一抗体。注意在此概念中的“单”是指单一的抗原刺激。

64. DNA 芯片 生物芯片的一种。是按照已知的 DNA 序列结构，在有对单、双链 DNA 区别能力的载体上进行单链 DNA 合成或直接喷涂制得的芯片。当这样的芯片和另外的游离单链 DNA 相遇时实现碱基配对互补，碱基互补的 DNA 片断和比例可以被 DNA 芯片以光电形式记录下来。

65. 生物制药 既是指用生物技术制药，也是指用生物技术获得的药物。目前所说的生物制药主要是指通过 DNA 重组、转基因、细胞与组织工程获得的多肽因子、酶、抗体、疫苗、反义 RNA 等。

66. 工程菌 经过基因改造后获得的微生物。

67. 后蛋白组工程 继人类基因组计划之后提出的面对蛋白质种类，对应的基因进行全面系统研究的计划。

68. 抗体酶 有酶活性的抗体。

69. 生物材料 以来自生物的物质作为工业材料。如纤维素、胶原蛋白、丝蛋白和甲壳素等。生物材料学研究如何开发利用已有的生物物质，创造超自然的生物材料。

70. 反义 RNA 按照基因的序列结构合成的 RNA。这样的 RNA 片断进入生物体内后可以和对应的基因碱基序列配对成为局部 DNA-RNA 三链杂交体，由此阻止该基因的转录。此技术用于有害基因引起的疾病的治疗。

以下名词答案略：

单糖与多糖	固相酶	转导与转化
糖苷	多酶体系	类病毒
肽	初速度	简拼
肽平面	乒乓机制	癌基因
氨基酸残基	齐变模型	大沟与小沟
次级键	诱导契合学说	复制体
盐溶与盐析	中间产物学说	复制叉
双缩脲反应	比活力	核小体
对角线电泳	胞外酶	魔斑
专一性水解	Alu 序列	70S 起始复合物
球蛋白与球状蛋白	质粒	时序调控
分子病与遗传病	PCR 技术	SD 序列
代谢缺陷型	无细胞体系	复杂度

基因家族	葡萄糖效应	表达载体
插入序列	探针	单克隆抗体
转座子	卡粒	外壳蛋白 (Capsid)
粘性末端	粘粒	接合
退火	λ 噬菌体	α 螺旋与 β 折叠
有意义链	基因组	DNA 双螺旋结构
不对称转录	肝素	DNA 半保留复制
转录单元	血糖	遗传密码
锁钥学说	持留时间 (HPLC)	限制和修饰系统
突变与诱变	R_f 值	翻译
定向诱变	分配系数	化学渗透理论
回文结构	等电聚焦	β 氧化
通读	密度梯度离心	血红蛋白别构调节
复制子	凝胶过滤	级联放大效应
核心酶	凝胶电泳	原核生物基因调控
同功酶	标准蛋白	真核生物基因调控
诱导酶	糖尿病	基因工程
酶原	回复突变	蛋白质工程
别构酶	琥珀突变	光合磷酸化

10.3 回答或简答

生物化学与分子生物学中有一些问题涉及的面较广，对这些问题的研究已基本有了定论，形成了在世界上公认的理论或模型，在试题中常用回答或简答的形式出现，完成这类试题的关键是要全面、准确、简炼和有层次。

例：简述化学渗透学说（假说）。

答：化学渗透学说是由英国生物化学家 Peten Mitchell 于 1961 年提出的，此假说用于解释氧化磷酸化的偶联机理，此假说要点如下：①线粒体内膜中递氢体和递电子体相间排列，递氢体有 H^+ 泵作用，将 H^+ 由膜内侧泵向膜外侧，由此产生跨内膜的 H^+ 梯度。②膜外侧 H^+ 在顺 H^+ 梯度，经专一通道返回膜内侧，此通道中 ATP 合成酶系统将 H^+ 跨膜电势差转化成 ATP 合成所需的能量。③此假说已得到广泛认可，证据有内膜的半透性和完整性、离子载体的抑制和 ATP 合成酶系统的深入研究。

说明： H^+ 跨膜浓度差是化学渗透假说的核心，电势差转变为 ATP 是这一假说的理论基础。由于是一个假说，应当不要忘记提出的人和此假说现在的状

况。

例：血糖水平是如何调节的？

答：血浆中的葡萄糖叫血糖，正常情况为 $80 \sim 120 \text{mg}\%$ ，血糖水平主要与糖原的分解与合成有关，神经和激素控制血糖水平。①神经调节。延脑“糖中枢”和交感神经兴奋促进血糖升高，“糖中枢”通过肝糖原分解升高血糖，交感神经通过激素，如肾上腺素升高血糖。②激素调节。胰岛素降低血糖，血糖升高促使胰岛素分泌。肾上腺素、胰高血糖素、生长激素、甲状腺素促使血糖升高。上述激素中肾上腺素通过 cAMP 为第二信使的级联放大效应使肝糖原水解成葡萄糖，使肌糖原分解成为乳酸，而甲状腺素促进糖异生，使乳酸转变为葡萄糖，胰岛素促进组织摄取葡萄糖，抑制肝糖原分解，促进肝糖原、肌糖原合成，胰岛素作用机理在于既影响细胞膜通透性，又降低 cAMP 浓度和增加 cGMP 浓度，胰岛素的膜受体还具有酪氨酸激酶活性。

说明：血糖调节是个很复杂的问题，有些方面仍在研究之中，只能选择最基本的知识回答，胰岛素受体研究、级联放效应等也可进一步详述，要根据答题时间决定。

例：DNA 半保留复制是如何被证实的？

答：DNA 半保留复制是 Meselson 和 Stahl 于 1958 年首先证实的，采用的方法为稳定同位素标记和密度梯度离心技术。将大肠杆菌连续 12 代培养在以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为惟一氮源的培养基中以使所有 DNA 分子均被 ^{15}N 标记，然后将 ^{15}N 完全标记的大肠杆菌转移到 ^{14}N 培养基中逐代分别培养。分别收集 ^{15}N 全标记和 ^{15}N 全标记后在 ^{14}N 培养基中培养一代、二代等各自的 DNA 并进行氯化铯密度离心后，可得到高密度带（ ^{15}N 带）、中密度带（ ^{15}N - ^{14}N 带）和密度逐渐接近最低密度（ ^{14}N 带），由此得知 DNA 是半保留或复制的，即子代 DNA 分子中的双链一条是旧的，一条是新合成的。 ^3H 脱氧胞苷标记实验和以后的其他方法均证实了 DNA 半保留复制。

说明：实验证实题是简答题中的一种类型，有许多重要理论是用实验证实的，学习中要关注这些理论的研究史，真正弄清实验的设计思路和采用的方法。否则，似懂非懂的回答必然遗误要点，缺少层次，废话太多。

10.4 论 述 题

为了检查学习中对某个问题了解的程度，特别是运用知识解决问题的能力，试题最后往往有论述题，即常说的发挥题，全面、灵活地运用所学的知识是回答论述题的关键，要学会联想，学会使用推理的方法。

例：烤红薯为什么吃起来甜香？

答：红薯是植物性食物，糖、蛋白质和脂肪是基本的营养成分。烤红薯的甜香是相对于生红薯和水煮蒸红薯而言的。烤红薯是在干燥、缓慢加热的条件下进行加工的，烤红薯水分含量所以低，相对而言等于提高糖和脂肪酸的浓度，烘烤过程很慢使淀粉酶、蛋白酶的作用时间比高温、快速蒸煮时的时间长。所以产生的单糖、双糖、三糖和氨基酸多，糖和氨基酸作用生成香味物质（美拉德反应）的量多，所以，烤红薯比蒸、煮的红薯甜且香。

说明：此题是检查学生对多糖、蛋白质酶促水解知识的应用，对于食品专业的学生说来，此题难度较小，但对于其他专业的学生，短时间内要想到完整的答案并非易事。

例：狗急跳墙如何解释？

答：狗急跳墙是狗的应急反应，主要涉及神经和激素的调节。①神经调节。狗遇到外界刺激（追赶等）后，视听感受器将外界刺激转化为神经冲动，神经冲动传导到中枢神经系统（大脑皮层）综合处理，通过传出神经对心脏、肺、骨骼肌等效应器分别发出指令，如外围血管收缩促使外周血回流，心脏收缩强度和心跳次数增加，使血压升高，肾上腺素分泌增加，呼吸加快，四肢协调收缩，产生跳跃动作。②激素调节。交感神经兴奋，肾上腺素分泌增加，血管平滑肌 α 受体与肾上腺素结合引起血管收缩， β 受体与肾上腺素结合引起血管舒张，肾上腺素经级联放大效应促使血糖升高，糖脂分解加速，及时提供四肢剧烈运动及心、肺强烈收缩与扩张所需的能量。跳跃运动的产生和代谢释能的加速共同导致狗急之后的跳墙。

说明：此题是一个生理生化问题，重点在于激素调节和神经调节协调产生运动的过程，神经调节重在说明反射弧，激素调节重在说明肾上腺素作用与糖、脂代谢关系。

10.5 实验设计问题

生物化学与分子生物学是一门实验学科，不仅要重视理论知识学习，实验原理与技术更应重视，师范院校的学生往往在实验方面有不足之处，完成此类试题有很大难度，解决这一难题的方法，除了平时认真完成实验课练习外，要认真阅读实验课教材，首先从原理上解决问题，以此弥补实验课内容的不足。

例：已知某种蟾蜍能够分泌一种剧毒的蛋白质，试设计一个实验方案用于提取和鉴定这种蛋白质。

答：蟾蜍分泌的毒蛋白是外分泌蛋白，可采用外分泌蛋白的提取方法，实验步骤如下：①收集毒液并妥善保存；②从毒液中分离全部蛋白质；③从毒液总蛋白质中分离毒蛋白；④对分离的毒蛋白进行纯化；⑤测定分子量、亚基数；⑥测

定一级结构；⑦预测二级结构或进行空间结构 X 射线衍射分析等；⑧写出实验结果。方法：①毒蛋白的毒理要首先基本搞清，如作用的底物是什么？可能的产物是什么？如果预先知道其底物，便可采用亲合层析的方法进行分离，从而简化了分离的步骤。②毒液总蛋白质分离可采用等电点方法，再经透析后获得总蛋白质。③获得的蛋白质混合物用凝胶过滤方式进行蛋白质各组分分离之后检测各组分的毒性，由此确定哪种蛋白质属毒蛋白。④重复上述操作，富集毒蛋白到一定量后进行纯化处理，可再次进行凝胶过滤。⑤纯度鉴定，可采用电泳分析，如等电聚焦。⑥结晶。⑦结构分析。

说明：蛋白质的分离纯化无固定方式可言，只能在各种方法中进行选择并搭配，所以选择和搭配是回答这类问题的关键，如是细胞内成分，就必须有破碎细胞步骤，如已知带某种电荷，可选用离子交换，如有专一性亲合成分，则可采用亲合层析，一般说来，蛋白质的分离纯化都有前处理→粗分离→细分离→结晶几步，具体方法不可能叙述的很详细。另外，如预知有非肽链组分，还需增加确定非肽链组分的步骤。

附 录

部分院校、研究所硕士研究生入学考试生物化学试题

中国科学院一九九三年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)

一、是非题: 20 题, 共 20 分, 每题答对得一分, 答错一题倒扣半分, 不答者不倒扣, 答“是”写“√”, 答“非”写“×”, 写在题后的 () 中。

1. 在免疫测定中, 单克隆抗体比多克隆抗体具有对抗原更强的专一性。 (✓)
2. 在蛋白质和多肽分子中, 只有一种连接氨基酸残基的共价键——肽键。 (×)
3. 丝氨酸和苏氨酸是蛋白质磷酸化的惟一的两个位点。 (×)
4. 所有的氨基酸中, 因 α 碳原子是一个不对称碳原子, 因此都具有旋光性。 (×)
5. 酶最适 pH 只取决于酶蛋白本身结构。 (×)
6. 负协同性不能用 MWC (序变模型) 理论解释。 (✓)
7. 除参与酶原活化和蛋白质降解之外, 蛋白水解酶还参与分泌型免疫球蛋白的分泌。 ()
8. 双关酶 (ambiguous enzyme) 和双功能酶都能催化一个以上化学反应。 (✓)
9. 麦芽糖是由葡萄糖与果糖构成的双糖。 (×)
10. 氧化磷酸化的解偶联剂都是质子载体。 (×)
11. 绿色植物光合作用的暗反应也称三碳循环。 ()
12. 磷脂酰胆碱是一种中性磷脂。 (×)
13. 体细胞 (双倍体) DNA 含量为生殖细胞 (单倍体) DNA 含量的两倍。 (✓)
14. 多核糖体 (polyribosome 或 polysome) 是由一定数目的核糖体 (ribosome) 联接而成。 ()
15. 所有生物催化剂都是蛋白质。 ()
16. 已知类病毒 (viroid) 是一类不含蛋白质的 RNA 病原体。 ()
17. 真核生物的基因不组成操纵子, 不形成多顺反子 mRNA。 (✓)

18. 蛋白质的氨基酸序列是由基因的编码区核苷酸序列决定的, 只要将基因的编码序列转入细胞, 就能合成相应的蛋白质。 ()

X 19. 氨基酸的分解代谢是先脱去氨基, 非氧化脱氨基作用普遍存在于动植物中。 (✓)

20. 葡萄糖是生命活动的主要能源, 酵解途径和三羧循环都是在线粒体内进行的。 (✓)

二、选择题: 10 题, 每题 1 分, 共 10 分, 选择答案的号码必须填入() 中。答错不倒扣。

1. 在寡聚蛋白质中, 亚基间的立体排布、相互作用, 以及接触部位间的空间结构, 称为: ()

(1) 三级结构; (2) 缔合现象; (3) 四级结构; (4) 变构现象。

2. 通过 cAMP 提高肝脏糖原磷酸化酶活性, 从而促进糖原分解, 但不促进肌肉的糖原分解的是: ()

(1) 肾上腺素; (2) 胰岛素; (3) 胸腺素; (4) 胰高血糖素。

3. 底物循环(无用循环)在代谢调节上主要功能是: ()

(1) 以消耗 ATP 形式释放热保持体温;

(2) 释放热能供其他代谢途径使用;

(3) 释放多余储备能量, 以达到能荷平衡;

(4) 控制代谢流向, 是一种代谢途径“开”或“关”式的调控方式, 并能确保机制对刺激作做出应急的反应。

4. 已知某种酶其活性部位有 Arg、Lys 残基参与底物结合, 因此可考虑选用哪种柱层析剂: ()

(1) DEAE-纤维素;

(2) 磷酸化纤维素;

(3) 苯基化葡聚糖;

(4) 三乙基氨基纤维素。

5. 粗糙型内质网系的主要功能是: ()

(1) 糖类的合成;

(2) 脂类的合成;

3 (3) 分泌性蛋白质的合成;

(4) 必须氨基酸的合成。

6. 鱼藤酮是: ()

(1) 解偶联剂;

(2) ATP 合成酶抑制剂;

(3) NADH—辅酶 O 氧化还原酶抑制剂;

(4) 细胞色素氧化酶抑制剂。

7. 痛风症(gout)是由于尿酸在体内(特别是关节内)过量积累而引起, 别嘌呤醇(allcollrinol)是治疗痛风的有效药物, 是因为别嘌呤醇能: ()

(1) 激活尿酸酶;

(2) 激活尿酸氧化酶;

(3) 抑制黄嘌呤氧化酶;

(4) 抑制鸟嘌呤脱氨酶。

8. 参与转录的酶是:

()

- (1) 依赖 DNA 的 DNA 聚合酶; (2) 依赖 DNA 的 RNA 聚合酶;
(3) 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶; (4) 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。

9. 在糖酵解代谢链中, 什么关键反应步骤决定酵解的速度:

()

- (1) 葡萄糖的磷酸化;
(2) 6-磷酸果糖磷酸化形成 1,6-二磷酸果糖;
(3) 磷酸三碳糖的同分异构化;
(4) 3-磷酸甘油磷酸将磷酰基转给 ADP 形成磷酸甘油和 ATP。

10. 脂肪酸的合成中, 每次碳链的延长都需要什么参加:

()

- (1) 乙酰辅酶 A; (2) 草酰乙酸;
(3) 丙二酸单酰辅酶 A; (4) 甲硫氨酸。

三、填空题: 16 题, 每空格答对给 1 分, 共 40 分。

1. 蛋白质二级结构的三种基本类型是____、____和____, 而胶原蛋白的二级结构是一种____。

2. 分离蛋白质混合物的各种方法主要根据蛋白质在溶液中的下列性质____、____、____、____。

3. 磺胺类药物抑制____合成, 最后导致对细菌生长繁殖的抑制。

4. 一个有效的自杀性抑制剂必须具备:

(1)____, (2)____, (3)____。

5. 谷氨酰胺合酶的活性可被____和____共价修饰调节, 这是存在于细菌中一种共价修饰调节酶活性的方式之一。

6. 直链淀粉是一种多糖, 它的单体单位是____, 它们以____键连接, 纤维素也是一种多糖, 它的单体单位是____, 它们以____键连接。

7. 磷脂酶 C 水解磷脂酰胆碱后生成____与____。

8. 在完整线粒体中, α -酮戊二酸脱氢化生成琥珀酸, 可生成相当于____分子 ATP。

9. ATP 水解生成 ADP 与无机磷酸时的标准自由能变化为 (ΔG°) 为____, 这个反应的平衡常数为____。

10. 凝集素是一类能与____相互作用的蛋白质。

11. 生物膜的内在蛋白质与膜的结合主要通过____键。

12. 核酸中的嘌呤环有四个氮原子, 生物合成时分别来自____、____、____; 嘧啶环中有两个氮原子, 分别来自____和____。

13. T_m 是 DNA 具有的一个重要特性, 其定义为____。

14. UMP 磷酸核糖转移酶催化尿嘧啶和 5-磷酸核糖-1-焦磷酸反应生成____。

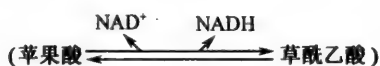
15. 含有腺苷酸的辅酶主要有_____、_____和_____。

16. 在脂肪酸分解代谢中,长链脂酰辅酶 A 以_____形式转运到线粒体内,经过_____作用,生成_____参加三羧酸循环。

四、问答题:5 题,每题 6 分,共 30 分。

1. 画出肌红蛋白和血红蛋白的氧合曲线,比较并加以简单说明。

2. 下表列出牛心细胞浆和线粒体中苹果酸脱氢酶的一些数据,请依据这些数据,试分析细胞浆和线粒体中苹果酸脱氢酶在苹果酸循环中(苹果酸穿梭)的调节意义。



	细胞浆中苹果酸脱氢酶	线粒体中苹果酸脱氢酶
分子量	52.000	62.000
等电点	4.6~4.7	5.5~5.6
$K_m(\text{苹果酸})$	$4.7 \times 10^{-4} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-4} \text{M}$
$K_m(\text{NAD}^+)$	$9.9 \times 10^{-5} \text{M}$	$9.9 \times 10^{-5} \text{M}$
$K_m(\text{草酰乙酸})$	4.2×10^{-5}	$3.4 \times 10^{-5} \text{M}$
$K_m(\text{NADH})$	2.7×10^{-5}	$5.2 \times 10^{-5} \text{M}$
草酰乙酸开始抑制浓度	$>0.3 \times 10^{-3}$ 也不抑制	$1.3 \times 10^{-4} \text{M}$ 开始抑制

3. 请写出:(1)完整线粒体内从 NADH 至 O_2 这段呼吸链的组成顺序;(2)产生偶联 ATP 合成的部位;(3)三个作用于这段呼吸链不同部位的抑制剂的名称及作用点。

4. 分别讨论氨甲酰磷酸和 5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸(PRPP)在代谢中的作用。

5. 简要说明分子生物学的中心法则。

中国科学院一九九四年攻读硕士学位研究生入学试题(B卷)

一、是非题:20题,共20分,每题答对得一分,答错一题倒扣半分,不答者不倒扣;答“是”写“√”,答“非”写“×”,写在题后的()中。

1. 和其他生物一样,每一种病毒含有 RNA 及 DNA 两种核酸。 ()
2. 单克隆抗体和多克隆抗体的区别在于后者可以抗多种抗原。 (×)
3. 乙烯是一种植物激素。 (✓)
4. 胰岛素在体内是先分别合成 A、B 两条链,然后再通过正确匹配的二硫键连接而成。 (×) ()
5. 蛋白质磷酸化和去磷酸化是可逆反应,该可逆反应是由同一种酶催化完成的。 (✓)
6. 某些癌基因表达产物具有不完整的激素受体结构。 (✓)
7. 所有别构酶都是寡聚蛋白。 (✓)
8. 凡有锌指结构(zinc finger structure)的蛋白质均有与 DNA 结合的功能。 (×)
9. 植物是绿色的,因为它们的叶绿体吸收与利用绿光效率最高。 (×)
10. 光合的总反应中, H_2O 中的氧渗入到葡萄糖中去。 (×)
11. 胆固醇是动脉粥样硬化的元凶,血液中胆固醇含量愈低对机体健康愈有利。 (×)
12. 脂肪酸氧化降解始于分子的羧端。 (×)
13. 所有 mRNA 上的起始密码子都是 AUG。 (✓)
14. 黄嘌呤氧化酶的底物是黄嘌呤,也可以是次黄嘌呤。 (✓)
15. 生物的复制方式有多种,通常是双向进行的,但滚动式复制却是单向的。 (✓)
16. 真核细胞和原核细胞核糖体中的 RNA 的数目和种类是相同的。 (✓)
17. 腺苷二磷酸(ADP)分子在腺苷酸激酶的作用下可生成一分子 ATP 和一分子 AMP。 (✓)
18. 苯丙酮尿症是先天性氨基酸代谢缺陷病,患者缺乏苯丙氨酸羟化酶或二氢喋呤还原酶,造成血或尿中苯丙氨酸和苯丙酮酸增多。 (✓)
19. ATP 是磷酸果糖激酶的底物,因而高浓度 ATP 可以加快磷酸果糖激酶催化 F-6-P 生成 F-1,6-2P 的速度。 (✓)
20. 真核生物蛋白质合成起始氨基酸是甲酰甲硫氨酸。 (✓)

二、选择题:10题,每题1分,共10分,选择答案的号码必须填入()中,答错不倒扣。

1. G 蛋白质与多种信息传导过程中,它是与下列哪一种配基结合的蛋白质:

①鸟苷酸;②cAMP;③Ca²⁺;④ATP。

2. 人免疫缺损病毒(HIV)引起爱滋病,这种病毒是一种:

①dsDNA 病毒;②ssDNA 病毒;③dsRNA 病毒;④ssRNA 病毒。

3. 线粒体基质中脂酰辅酶 A 脱氢酶的辅基是:

①FAD;②NADP⁺;③NAD⁺;④GSSG。

4. 在接近中性 pH 的条件下,下列哪种基团既可作为 H⁺ 的受体,也可作为 H⁺ 的供体:

①His-咪唑基;②Lys-ε-氨基;③Arg-胍基;④Cys-巯基。

5. 维生素 D 的结构是一种:

①醇;②酚;③醛;④酮。

6. 脂双层的厚度大约为

①5~8nm;②50~80nm;③500~800nm;④5~8μm。

7. 5'-磷酸核糖与 ATP 作用生成 5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸(PRPP),催化这一反应的酶是:

①磷酸核糖激酶;②磷酸核糖焦磷酸激酶;③磷酸核糖酶;④ATP 激酶。

8. 反转录酶是一类:

①DNA 指导的 DNA 聚合酶;②DNA 指导的 RNA 聚合酶;
③RNA 指导的 DNA 聚合酶;④RNA 指导的 RNA 聚合酶。

9. 叶绿素中含有的金属离子是:

①Fe²⁺;②Cu²⁺;③Mg²⁺;④Ca²⁺。

10. ppGpp 在下列情况下合成:

①细菌缺乏氮源时;②细菌缺乏碳源时;
③细菌在环境温度太高时;④细菌在环境温度太低时。

三、填空题:17 题,40 空格,每空格答对给 1 分,共 40 分。

1. 蛋白质是两性电介质,当溶液的 pH 在其等电点以上时蛋白质分子带_____电荷,而 pH 在等电点以下时,带_____电荷。

2. Southern 印迹法、Northern 印迹法和 Western 印迹法是分别用于研究_____、_____和_____转移和鉴定的几种常规技术。

3. 昆虫从卵到成虫的几个阶段,都受_____和_____两种激素的协调作用控制,而它们本身又受_____调节。

4. 酶与蛋白质相互作用是广泛存在的,例如酶与抗体,酶(蛋白)与蛋白激酶,酶与蛋白激活剂或抑制剂,除此之外还有_____。

5. 多酶复合物体系总的反应速度取决于其中_____反应,一般来说大部分

具有自我调节能力的多酶体系的_____就是限制速度的步骤。

6. 在动植物中,脂肪酸降解主要途径是_____作用,而石油可被某些细菌降解,其起始步骤是_____作用。

7. 酮体是指_____、_____和_____。

8. 人工模拟生物膜的系统主要有_____与_____。

9. 低密度脂蛋白的主要生理功能是_____。

10. 哺乳动物自身不能合成_____酸和_____酸,因此这二种脂肪酸被称为必需脂肪酸。

11. 生物膜主要组分是_____与_____。

12. 氧化磷酸化 P/O 比值是指_____。

13. 核糖核苷二磷酸在核糖核苷酸还原酶作用下,生成脱氧核糖核苷二磷酸,需要_____和_____参与。

14. 别嘌呤醇对嘌呤氧化酶有很强的抑制作用,能治疗痛风症,是由于它的化学结构与_____很相似,减少_____在体内过量积累。

15. 核苷激酶、核苷酸激酶、核苷二磷酸激酶和多核苷酸激酶的底物分别是核苷、核苷酸、核苷二磷酸和多核苷酸,反应产物分别是_____、_____、_____和_____。

16. 生物体内各类物质有各自的代谢途径,不同代谢途径可通过交叉点上的关键中间物而相互转化,使各代谢途径得以沟通形成网络,其中三个最关键的中间代谢物是_____、_____和_____。

17. 核苷三磷酸在代谢中起着重要的作用。_____是能量和磷酸基团转移的重要物质,_____参与单糖的转变和多糖的合成,_____参与卵磷脂的合成,_____供给肽链合成时所需要的能量。

四、问答题:5 题,每题 6 分,共 30 分。

1. 大肠杆菌含有 2000 种以上的蛋白质,为了分离它所表达的一个外源基因的产物并保持它的活性,常有很大困难。但为了某种目的,请根据下列要求写出具体的方法。(6 分)

(1)利用溶解度差别进行分离。

(2)利用蛋白质分子大小进行分离。

(3)根据不同电荷进行分离。

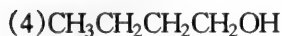
(4)已制备有该产物的抗体进行分离。

(5)产物的浓缩。

(6)产物纯度的鉴定。

2. 简述 β -肾上腺素促进糖原降解的大致途径,并扼要说明蛋白激酶在该过程中的作用及生理调节意义。(6 分)

3. 将下列六个化合物按被动扩散典型生物膜的速度,由低至高排队(假定该生物膜上没有专一的传送蛋白,pH 为 7,化合物由浓度高的一侧向另一侧扩散)。



4. 写出真核 mRNA 的帽子结构式。(6 分)

5. ApCpUpApGoH 经蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶完全酶解的产物分别是什么?(6 分)

北京大学一九九一年研究生入学考试试题

一、名词解释:(共 5 个,每个 2 分,共 10 分)

1. 拼接体(spliceosome)
2. 复制子(replicon)
3. 反馈调节(feedback regulation)
4. 别构效应(allosteric effect)
5. 抗体酶(abzyme)

二、写出下列英文符号的中文名称(共 10 个,每个 1 分,共 10 分)

1. THF
2. ddNPP
3. ACTH
4. Hbs
5. tRNA^m
6. micRNA
7. ACP
8. NADPH
9. $\Delta G^{\circ'}$
10. $Cot\frac{1}{2}$

三、填空题:(共 30 个空格,每格 1 分,共 30 分)

1. NAD^{+} 和 $NADP^{+}$ 还原时,在_____增加一个吸收峰。
2. 常用的 DNA 超螺旋结构的嵌合剂是_____。
3. 在癌变过程中同工酶谱发生_____。
4. 哺乳动物的必需脂肪酸为_____和_____。
5. 某些蛋白质前体都具有_____肽,它们大都是大约相当于_____左右氨基酸的长度,残基侧链一般呈_____,位于肽链的_____端。
6. 糖蛋白中糖基与蛋白质肽链可通过两类糖苷键结合,即:_____和_____。
7. DNA 序列测定的末端终止法所用的工具酶是_____。
8. 大肠杆菌 RNA 聚合酶全酶的亚基组成为_____。没有_____亚基的酶称为核心酶,该亚基的功能为_____。
9. 线粒体 DNA 的复制为_____方式; Φ X174 环状 DNA 和噬菌体 DNA 后期复制为_____方式;大肠杆菌染色体 DNA 的复制为_____方式;真核生物染色体 DNA 复制为_____方式。

10. 呼吸链电子传递速度受_____浓度控制的现象称为受体控制。
11. 胆固(甾)醇合成的限速酶是_____,_____浓度升高其活性下降。
12. 嘧啶环是由_____和_____合成的。
13. 丙酮酸脱氢酶系统受_____,_____和_____三种调节控制。
14. 神经递质 5-羟色胺由_____衍生而成。
15. 乙酰 CoA 进入三羧循环,还是形成酮体,由细胞中_____浓度决定。
16. 生物固氮是微生物利用_____转变成氨的作用。

四、是非题:是打(√),否打(×)。(共 15 题,每题 1 分,共 15 分)

1. 多顺反子 mRNA 含有多个 SD 序列,起始密码子和终止密码子各编码区的翻译效率彼此不同。 ()
2. 酶的 K_{cat} 型抑制剂比 KS 型抑制剂专一性更强。 ()
3. 紫外线照射可使 DNA 互补双链间形成胸腺嘧啶二聚体。 ()
4. 一个氨基酸残基就是一个肽单元。 ()
5. DNA 复制需要 RNA 引物, RNA 复制则不需引物。 ()
6. 蛋白质进化过程中构象是易变的。 ()
7. 由于遗传密码的简并性,一个氨基酸可以有几种 tRNA,但通常只有一种氨酰-tRNA 合成酶。 ()
8. 蛋白质在热力学上最稳定的构象是自由能低的结构。 ()
9. 当一种大肠杆菌突变型为 DNA 聚合酶 III 的 3'→5'外切酶缺陷时,该突变型表现的特征为对紫外线敏感。 ()
10. 在酸性条件下 DNA 分子上的嘌呤不稳定,易被水解下来。 ()
11. 严重糖尿病患者因其糖原异生作用加强导致血酮症。 ()
12. 杀鼠药氟乙酸的毒性是由于其抑制了顺乌头酸酶,从而阻断了三羧酸循环。 ()
13. 无糖膳食中含奇数碳脂肪酸比含偶数碳脂肪酸的脂肪作为食物更好。 ()
14. 高胆固醇血症患者因服用 β -谷固醇而引起血浆胆固醇水平升高,增加动脉硬化危险。 ()
15. 安密妥(amytal)和抗霉素 A 阻断呼吸链的抑制百分数相同时,安密妥毒性更大。 ()

五、分析与计算题:(共 35 分)

1. 当谷氨酸 C_3 上标记 ^{14}C ,氨基上标记 ^{15}N ,在肝脏中氧化降解,同位素将出现在下列代谢物的哪个原子上。(5 分)
(1)琥珀酸;(2)天冬氨酸;(3)精氨酸;(4)尿素。
2. 今有以下 4 种蛋白质的混合物:

(1)分子量 15000, $pI=10$;

(2)分子量 62000, $pI=4$;

(3)分子量 28000, $pI=8$;

(4)分子量 9000, $pI=6$ 。

若不考虑其他因素,当(A)用 CM-纤维素层析柱分离时,(B)用 SephadexG₅₀ 凝胶层析柱分离时,试写出这些蛋白质的洗脱顺序。(5分)

3. 在以下的修饰碱基中,何者在形成双链时氢键结合的性质不同于和它相关的普通碱基?(2分)

(1)2-甲基腺嘌呤;(2)5-甲基胞嘧啶;(3)5-羟甲基胞嘧啶;(4)1-甲基鸟嘌呤。

4. 假定下面的 DNA 双链是从右向左进行转录,写出 RNA 转录产物的序列。(3分)

5'.....ATTGCTTAAGCAA.....3'
3'.....TAAGCGAATTCGTT.....5'
←

转录方向

5. 某酶制剂的比活力为 42 单位/毫克蛋白质,每毫升含 12mg 蛋白质。

(1)计算 1ml 反应液中含 5 μ l 酶制剂时的反应初速度。

(2)若 1ml 反应液内含 5 μ l 酶制剂,在 10 分钟内消耗底物多少? 为保证测定酶的初速度,所需要的最低底物浓度是多少?(5分)

6. 有一酶分子使其变性后,用溴化氰降解。在降解产物中得到一个未知氨基酸顺序的九肽,试根据以下实验结果推断出此九肽的氨基酸顺序。(5分)

(1)氨基酸分析表明,它含有 Ala、Arg、Cys、Glu、Lys、Met、Pro、Phe₂;

(2)用 Edman 法降解得到一个 Pro 的衍生物;

(3)用胰蛋白酶水解得到一个游离 Arg、一个二肽和一个六肽,这个六肽在 pH6.4 时呈电中性状态;

(4)用凝乳酶降解得到一个二肽、一个三肽和一个四肽,①二肽在 pH6.4 时呈负电荷,②分析三肽,发现里面含有硫,③在 pH6.4 时分析四肽,它的净电荷为 +2,在 280nm 分析表明含芳香族氨基酸。

以下考题分二组,第一组为非生化专业必做;第二组为生化专业必做。

第一组(非生化专业做)

1. 如何判明 DNA 制剂的纯度和是否为天然双链分子?(5分)

2. 如果细菌环状染色体的复制是双向的,并且从固定的复制起点开始,每个复制叉以 16 μ m/min 的速度移动,细菌染色体长 1280 μ m,完成整个染色体复制所需时间是多少? 当细菌在营养丰富的培养基中每 20 分钟细胞分裂一次,也就是说

第一轮复制尚未完成就需开始第二轮复制,此时染色体有几个复制叉?(5分)

第二组(生化专业做)

1. 利用标记的 16S rRNA 和未标记的细菌 DNA 进行分子杂交表明,在饱和时每 $100\mu\text{g}$ DNA 能结合 $0.071\mu\text{g}$ 的 16S rRNA(分子量为 5.3×10^5)。该细菌细胞含有 2.6×10^9 道尔顿的 DNA。试计算每个细菌基因组所含 16S rRNA 基因的拷贝数。(5分)

2. 用琼脂糖凝胶电泳分离制备的质粒,分出三条带,请设计实验判断何者为开环 DNA(open circular DNA),何者为线性 DNA(linear DNA),何者为共价闭环 DNA(covalent closed circular DNA)。(5分)

北京大学一九九二年研究生入学考试试题

一、名词解释:(共 5 个,每个 3 分,共 15 分)

1. ribozyme
2. 衰减子(attenuator)
3. 第二信使(second messenger)学说
4. 酮体(ketone bodies)
5. 钠钾离子泵(Na^+ 、 K^+ -pump)

二、写出下列英文符号的中文名称:(共 10 个,每个 1 分,共 10 分)

1. DHU;
2. GHS;
3. cccDNA;
4. NADP^+ ;
5. GH
6. MSH;
7. cGMP;
8. LTR;
9. ATCase;
10. PRPP

三、填空题:(共 30 个空格,每个 1 分,共 30 分)

1. DNA 合成的方向是_____。RNA 转录的方向是_____。蛋白质合成的方向是_____。
2. hnRNA 经 RNA 拼接过程去掉_____,留下_____。
3. 原核生物蛋白质合成的起始 tRNA 是_____,它携带的氨基酸是_____,而真核生物蛋白质合成起始 tRNA 是_____,它携带_____氨基酸。
4. 将重组 DNA 引入受体细胞,这一过程称为_____。
5. tRNA 的二级结构呈_____形,它的 3'一端为_____,5'一端为_____。
6. 胰岛素受体蛋白质存在于_____。
7. 胰凝乳蛋白酶的亲和标记试剂是_____,它作用于酶活性中心的_____。
8. 维持蛋白质三级结构最重要的作用力是_____。
9. 高等动植物含有一个不饱和键的脂肪酸,其双键位置一般在第_____碳原子之间。
10. 性激素与靶细胞受体结合后,进入细胞核与_____作用,从而调节基因表达。
11. 维生素 D_3 的活性形式是_____。
12. 纤维素和淀粉分子结构的区别在于:纤维素的葡萄糖分子是以_____连接而成,而淀粉是以_____形式连接而成。
13. 在脂肪酸生物合成中酰基的载体为_____,在脂肪酸氧化中酰基的载体为_____。
14. 氨基酸代谢的一碳单位主要由_____供给,核苷酸生物合成中的一碳单位由_____供给。

15. 糖酵解过程在细胞的_____部位进行,柠檬酸循环在细胞的_____部位进行,氧化磷酸化在细胞的_____部位进行,光合磷酸化在细胞的_____部位进行。

四、是非题:是打(√),否打(×)。(共 15 题,每题 1 分,共 15 分)

1. 激素孕二醇的原初作用部位在细胞核。
2. 在细菌培养物由供氧条件转为厌氧条件时,葡萄糖的利用速度增加。
3. 氰化物引起缺氧是由于抑制底物磷酸化。
4. 细胞液中脂肪酸合成需要线粒体产生乙酸,而乙酸是由乙酰 CoA 将它带出线粒体膜。
5. 所有蛋白质的克分子消光系数都是一样的。
6. 促甲状腺激素是由垂体前叶分泌的含糖基的单链蛋白质。
7. 抑制剂对酶的抑制作用是酶变性失活的结果。
8. 糖苷键对碱稳定,而易被酸水解。
9. 限制性内切酶的生物学作用是分解外源的 DNA。
10. 别构酶动力学曲线都呈 S 形。
11. DNA 是遗传物质, RNA 不是遗传物质。
12. 双螺旋 DNA 复制后,子代 DNA 不含有亲代的成分。
13. 在蛋白质合成中起始合成时,起始 tRNA 结合核糖体 A 位。
14. 每个原核细胞染色体上只有一个复制起点,而每个真核染色体则有许多复制起点。

15. 原核生物转录启动子(promoter)有三个重要部位: -10 区(Pribnow box)、-35 区及 SD 序列。

五、分析与计算题:共 30 分。

1. 今有一个九肽,分别用(1)胰蛋白酶、(2)胰凝乳蛋白酶、(3)羧肽酶 B、(4)溴化氰处理,试用箭头及号码表示出它们对肽键作用的位置。(2 分)

Leu-Met-Arg-Pro-Ala-Lys-Tyr-Ser-Arg

2. 一个大肠杆菌细胞中含 10^6 个蛋白质分子,假设每个蛋白质分子平均分子量为 40000,并且所有的分子都处于 α 螺旋构象,试计算每个大肠杆菌细胞中蛋白质肽链的总长度(以 cm 表示)。(4 分)

3. $1\mu\text{g}$ 纯酶(分子量为 92000),在最适条件下,催化反应速度为 $0.5\mu\text{mol}/\text{min}$ 。计算:(1)酶的比活力(单位/mg 蛋白质);(2)转换数(TN 值)。(4 分)

4. 请分别指出(1)DNA 复制、(2)RNA 合成、(3)蛋白质合成三个过程的忠实性是如何保持的?(5 分)

5. 用纯化的脂肪酸合酶进行脂肪酸的体外合成

(1)假设用作底物的乙酰辅酶 A 中的甲基为 ^3H 所标记($\text{C}^3\text{H}_3\text{-CO-S-CoA}$),那

么所形成的软脂酸(16:0)中哪些 H 原子将被³H 标记?

(2)假设用作底物的丙二酰辅酶 A 中的两个 H 被³H 标记($\text{^-OOC-C}^3\text{H}_2\text{-CO-S-CoA}$),那么所形成的每分子软脂酸,将有几个 H 原子被标记?(5 分)

以下考题分二组,第一组为非生化专业必作,第二组为生化专业必作。

第一组(非生化专业作)(共 2 题,每题 5 分)

1. 假定在一细胞匀浆中,糖酵解、柠檬酸循环、电子传递和氧化磷酸化均充分活跃,NADH 不需要穿梭作用即可进入电子传递链,那么下列各化合物完全氧化时,每分子能产生多少个 ATP?

(1)丙酮酸;(2)葡萄糖;(3)NADH;(4)F-1,6-2P

2. 如果有一个突变体,其 δ 产生突变,以致 δ 不能离开 RNA 聚合酶的核心,那么这种突变会对转录过程产生什么影响?

第二组(生化专业做)(共 2 题,每题 5 分)

1. *E. Coli* 一种体外蛋白质合成系统,由多聚核苷酸 AUG UUU UUU UUU UUU 指导 fMet-Phe-Phe-Phe 合成(AUG 是 fMet 的密码子,UUU 是 Phe 的密码子),在 farsomycin(一种新抗生素)存在下,这个多聚物只能指导合成 fMet-Phe。试问:

(1)farsomycin 抑制了多肽合成的哪一步?

(2)没有受抑制的寡肽或受抑制的二肽产物在应终止时与 tRNA 相连吗?请解释。

2. 假定有一只体重 250g 的大白鼠,其呼吸强度为 $500 \mu\text{lO}_2/\text{克体重/小时}$,请计算 24 小时内它能产生多少克 ATP?(假定呼吸强度不变,呼吸途径只有 EMP-TCA 途径,以标准状况计)(ATP 分子量为 507)。

北京医科大学一九九三年招收硕士研究生试题

I 问答题[说明:生物化学专业考生必答(1)、(2)并再选答四道题。非生物化学专业考生选答六道题,每题 10 分,共 60 分]

(1)原核生物蛋白质合成起始复合物由哪些成分组成? 图示该复合物的形成过程。

(2)试比较 DNA 复制和转录的异同。

(3)DNA 热变性时,OD260 值随温度缓慢升高而增高;在降温时,OD260 值如何随温度变化? 解释原因。

(4)牛胰核糖核酸酶能否水解 pGpGpApGpApA 序列? 若能,在何处水解,产物为何物? 若不能说明原因。

(5)写出真核 mRNA 的结构组成,并说明其前体 hnRNA 成熟为 mRNA 所需的几种转录后加工过程。

(6)将 α -磷酸甘油用同位素 ^{14}C 标记(标记部位见下面结构式)后,加肝匀浆中,在适宜条件下进行反应,试问以过一段时间后,测定此肝匀浆中的葡萄糖、脂肪酸、胆固醇、丙氨酸等是否含 ^{14}C ? 请扼要解释为什么?

(7)请写出四种由甘氨酸参与合成的不同类型的生物活性物质,并分别说明它们的主要功用。

(8)简述新生儿核黄疸的原因。

II 填空题(每题 1 分,共 20 分)[必答]

1. 嘌呤核苷酸代谢的最终产物是_____,如生成过多则出现_____症。

2. 重组 DNA 技术包括:切割目的基因片段,切割载体 DNA 将_____插入_____DNA 中等。

3. DNA 中的内含子(intron,插入子)是指_____,外显子(exon,表达子)是指_____。

4. 蛋白质合成的调控,主要是在_____水平进行。

5. DNA 的合成方向是_____,多肽合成方向是_____。

6. 蛋白质合成时起动信号的密码通常是_____,起始 tRNA 上的反密码子是_____。

7. 克分子丙酮酸在体内彻底氧化产生 CO_2 、 H_2O 和_____克分子 ATP。

8. 写出下列化合物的中文名称:PAPS_____,HMGCpA_____。

9. 就化学本质而言,酶原激活的过程就是_____的过程。

10. 如果双链 DNA 其中一条链部分序列为 pGpCpTpGpGpA,另一条链的互补序列为_____。

11. 除维生素 C 外,其他水溶性维生素重要生理意义都是通过_____功能表现的。

12. 胆固醇转变成胆汁酸的限速酶是_____。

13. 肝脏进行生物转化时对葡萄糖醛酸的活性供体是_____。

14. cAMP 在代谢调节中的作用主要通过对_____的激活来实现。

15. 用凯氏定氮法测得正常人血清分氮量为 11.584mg/ml,以此求得正常人血清蛋白质含量(g/100ml)为_____。

16. 加单氧酶主要由_____和_____组成。

17. 合成脂肪酸的原料是_____和_____。

18. 紫外线照射可在相邻的两个_____嘧啶间形成_____。

19. 胆固醇生物合成的限速酶是_____,胆固醇可反馈阻遏_____酶,从而减少肝中胆固醇合成。

20. 合成糖原时,葡萄糖活性供体是_____。合成卵磷脂时所需的活性胆碱是_____。

III 选择题(请在最佳答案的标号上打圆圈,每题 1 分,共 20 分)[必答]

(1)DNA 复制中,解开双螺旋的酶是

A. 拓扑酶;B. 螺旋酶;C. DNA 结合蛋白;D. 连接酶;E. 引物酶

(2)嘧啶核苷合成途径中,首先出现的是

A. 一磷酸胞苷;B. 一磷酸尿苷;C. 乳清酸;D. 氨甲酰磷酸;E. 二氢乳清酸

(3)在“抢救”途径(“重新利用”途径)中参与腺嘌呤再利用的酶是

A. 二氢叶酸还原酶; B. 腺苷酸脱氢酶;
C. 腺嘌呤磷酸核糖转移酶; D. 鸟嘌呤次黄嘌呤磷酸核糖转移酶;
E. 腺苷酸琥珀酸裂解酶

(4)成熟的真核生物 mRNA 5'端具有

A. 聚(poly)A;B. 聚(poly)U;C. 聚(poly)C;D. 聚(poly)G;E. (cap structure)帽结构

(5)下述对 DNA 聚合酶的描述哪一种是错误的

A. 具有 5'→3'外切活性; B. 具有 3'→5'外切活性;
C. 具有 5'→3'聚合活性; D. 具有 3'→5'聚合活性;
E. 以上都不对

(6)下列哪种化合物不是高能磷酸化合物

A. ADP; B. 磷酸肌酸; C. 1,3 二磷酸甘油酸;
D. 磷酸烯醇式丙酮酸; E. 一磷酸葡萄糖

(7)胞液里产生的 NADH 可以

A. 直接进入线粒体氧化;

- B. 交给 FAD, FAD 可进入线粒体氧化;
C. 由肉毒碱帮助进入线粒体;
D. 通过线粒体内膜上的相应载体而进入线粒体;
E. 还原磷酸二羟丙酮, 其还原产物可进入线粒体

(8) 儿茶酚胺是由哪种氨基酸转化生成的

- A. 色氨酸; B. 谷氨酸; C. 天门冬氨酸; D. 酪氨酸; E. 赖氨酸

(9) 呼吸链与磷酸化相偶联的部位是

- A. $\text{FAD} \rightarrow \text{CoQ}$; B. $\text{FMN} \rightarrow \text{CoQ}$; C. $\text{CoQ} \rightarrow \text{Cytb}$;
D. $\text{Cyt c} \rightarrow \text{Cytaa}_3$; E. $\text{NADH} \rightarrow \text{FMN}$

(10) 已知某人从膳食中每日食入蛋白质 50g, 每日排出氮量为 10g, 则此人的氮代谢处于_____平衡状态

- A. 氮正平衡; B. 氮负平衡; C. 氮总平衡; D. 以上都不是; E. 以上 A、C 均正确

(11) 变构效应物与酶结合的部位是

- A. 活性中心的底物结合部位; B. 活性中心的催化基因;
C. 酶的 -SH 基; D. 活性中心以外特殊部位
E. 活性的中心以外任何部位

(12) 关于变构调节正确的是

- A. 所有变构酶都有一个调节亚基、一个催化亚基;
B. 变构酶的动力学特点是酶促反应与底物浓度的关系呈 S 形而不是双曲线形;
C. 变构激活和酶被离子、激活剂激活的机制相同;
D. 变构抑制与非竞争性抑制相同;
E. 变构抑制与竞争性抑制相同

(13) 在生理条件下合成血红素的限速步骤是合成

- A. 胆色素原; B. 细胞色素; C. 原卟啉 II; D. 尿卟啉原 III; E. γ -氨基- γ -酮戊酸

(14) 下列哪种蛋白质不含铁

- A. 细胞色素 P450; B. 细胞色素 c; C. 肌红蛋白; D. 球蛋白; E. 过氧化酶

(15) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的生理作用是

- A. 使血钙升高, 血磷降低; B. 使血钙降低, 血磷升高;
C. 使血钙、血磷均升高; D. 使血钙、血磷均降低;
E. 对血钙、血磷浓度无明显影响

(16) 一个酶作用于多种作用物时, 其天然作用物的 K_m 值应该是

- A. 最大; B. 与其他作用物相同; C. 最小; D. 居中; E. 与 K_s 相同

(17) 常用于开链肽 N 端氨基酸测定的试剂是

- A. 异硫氰酸苯; B. 胍; C. 2,4 二硝基苯; D. 丹磺酰氯; E. 苯乙内酰硫脲

(18)利用蛋白质颗粒带电荷物质进行的操作技术有

- A. 电泳和薄层层析;
- B. 超速离心和超滤;
- C. 凝胶过滤和紫外吸收;
- D. 亲和层析和免疫电泳;
- E. 电泳和离子交换

(19)DNA 受热变性时

- A. 在 260nm 波长处的吸光度下降;
- B. 多核苷酸链断裂成寡核苷酸链;
- C. 碱基对可形成共价连接;
- D. 加入互补 RNA 链,再冷却,可形成 DNA-RNA 杂交分子;
- E. 溶液粘性增加

(20)下列关于蛋白质结构叙述不正确的是

- A. 三级结构即具有空间构象;
- B. 各种蛋白质均具有一、二、三、四级结构;
- C. 一级结构决定高级结构;
- D. α 螺旋属二级结构形式;
- E. 无规卷曲是在一级结构基础上形成的

北京医科大学一九九四年招收硕士研究生试题

I 问答题。说明:生物化学专业考生必答(1)(2)题,并再选答四道题;非生物化学专业考生选答六道题。每题 10 分,共 60 分

(1)请说明 DNA 复制过程有哪些酶参加,各起何作用?

(2)A:根据当前认识,限制性核酸内切酶识别 DNA 的序列多属回文结构,基于上述认识,请完成下列结构:

5'..... G A A _ _ _3'
3'..... _ _ _ _ _5'

B:基因工程大致分几个步骤,请简要说明之。

(3)以简图表示真核生物 mRNA 的结构及其特点,并说明其前体(hnRNA)成熟为 mRNA 所需的几种转录后加工过程。

(4)简述硬脂酸氧化过程并计算一克分子硬脂酸被彻底氧化可生成多少克分子 ATP?

(5)试述血氨的来源和去路。

(6)试述肝细胞微粒体中含细胞色素 P450 的氧化体系的特点。

(7)以图表示作用物浓度、酶浓度、温度和酸碱度对酶促反应速度的影响。(标明纵、横坐标,并写出必要条件和可能的关系式)

(8)A:有一份核酸样品,可能杂有少量蛋白质,只允许定性测定一种元素,即可确定其有无蛋白质污染,您选测哪一种元素,理由是什么? B:有多种方法可区分高分子量的 DNA 与 RNA 分子,请写出一种最简单可行的生化分析方法,并简要说明理由。

(9)磷酸酶、磷酸化酶、激酶、蛋白激酶有何区别? 请各举一例。

II 填空题(每题 1 分,共 20 分)[必答]

(1)对酶的非竞争性抑制作用与竞争性抑制作用的不同点在于 K_m 值和最大速度,非竞争性抑制作用_____不变,竞争性抑制作用_____不变。

(2)写出下列物质的中文名称

HDL 是_____;HMGCoA 是_____。

(3)磷酸戊糖途径的主要生理功用是_____与_____。

(4)酶结构的调节包括_____调节与_____调节。

(5)合成 UTP 的直接前体是_____;合成 CTP 的直接前体是_____。

(6)能提供一碳单位的氨基酸有_____、_____。

(7)参与组成辅酶 A 的维生素是_____;参与组成 NAD⁺ 和 NADP⁺ 的维生素是_____。

- (8) 1 分子丙酮酸氧化成水与 CO_2 可产生 _____ 分子 ATP。
- (9) 次黄嘌呤核苷酸合成腺苷酸过程中由 _____ 提供氨基。
- (10) zDNA 是 _____ 手螺旋, 每周由 _____ bp 构成。
- (11) 因肾功能不良引起的肾性佝偻病, 其主要原因是 _____。
- (12) 基因转录水平研究证明 _____ 调控模型是原核生物普遍存在的现象。
- (13) 胆红素在血中是由 _____ 帮助运载的。
- (14) 所谓结合胆红素主要是指与 _____ 结合的胆红素。
- (15) 调节钙磷代谢的主要激素, 除甲状旁腺素及降钙素外还有 _____。
- (16) 核酸杂交术主要是利用碱基配对原理, 经 _____ 性和 _____ 性两个操作过程以检查核酸的同源性。
- (17) 白化病是由缺乏 _____ 酶引起黑色素生成障碍所致。
- (18) 真核生物中已发现三种 RNA 聚合酶, 其中 _____ 催化的转录产物是 mRNA。
- (19) 代谢物脱氢氧化通过第一条呼吸链其 P/O 比值是 _____; 通过第二条呼吸链其 P/O 比值是 _____。
- (20) 合成糖原时, 葡萄糖活性供体是 _____; 合成卵磷脂时所需的活性胆碱是 _____。

III 选择题(请在最佳答案的标号上打圆圈、每题 1 分, 共 20 分)[必答]

(1) 糖原分子中葡萄糖单位之间存在什么类型键:

- A. 只有 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键; B. 有 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键与 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键;
C. 有 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键与 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键;
D. 只有 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键; E. 以上都不是

(2) 三羧酸循环中的某一中间产物经转氨基作用后可直接生成下列的一种氨基酸是:

- A. Ala; B. Ser; C. Glu; D. Lys; E. Arg

(3) HbO_2 解离曲线呈 S 形的主要原因是:

- A. Hb 中含有 Fe^{2+} ; B. Hb 系四条肽链组成;
C. Hb 存在于红细胞内; D. 由于别构效应;
E. 由于存在着 2,3-DPG

(4) 下述对血红蛋白的叙述哪项是错误的:

- A. 血红蛋白是由 α 亚基及 β 亚基组成的;
B. 血红蛋白的辅基为亚铁血红素;
C. 血红蛋白的蛋白部分为球蛋白;
D. 高铁血红蛋白没有携氧功能;
E. 血红素的代谢转归为生成胆色素

(5)氰化物和一氧化碳可以抑制:

- A. 硫铁蛋白; B. 递氢体黄酶; C. 细胞色素 b; D. 细胞色素 a, a_3 ;
E. 细胞色素 c

(6)依赖 cAMP 的蛋白激酶(PKA):

- A. 使蛋白质中丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化;
B. 使蛋白质中酪氨酸或苏氨酸残基磷酸化;
C. 使蛋白质中丝氨酸或酪氨酸残基磷酸化;
D. 使蛋白质中丝氨酸或谷氨酸残基磷酸化;
E. 使蛋白质中苏氨酸或谷氨酸残基磷酸化

(7)转录过程与反转录过程的共同点是:

- A. 模板相同; B. 酶相同;
C. 需要 DNA 指导的 DNA 聚合酶参与;
D. 产物相同; E. 原料相同

(8)DNA 受热变性时,

- A. 碱基间的磷酸二酯键断裂; B. 形成三股螺旋;
C. 碱基对以共价连接; D. 溶液粘度增加;
E. 在有 DNA 存在下 DNA 溶液冷却时,可形成 DNA-RNA 杂交分子

(9)用寡聚脱氧胸苷酸纤维素(oligo-dT 纤维素)分离纯化 mRNA 的层析方法

称:

- A. 离子交换层析; B. 排阻层析; C. 亲和层析; D. 反相层析; E. 高效液相层析

(10)下列化合物中,不能由酪氨酸合成的是:

- A. 甲状腺素; B. 肾上腺素; C. 苯丙氨酸; D. 黑色素; E. 多巴胺

(11)肌肉中氨基酸脱氨基的主要方式是:

- A. 联合脱氨作用; B. L-谷氨酸氧化脱氨作用;
C. 转氨基作用; D. 嘌呤核苷酸循环;
E. 鸟氨酸循环

(12)嘌呤核苷酸和嘧啶核酸合成时,共同需要的物质是:

- A. 延胡索酸; B. 甲酸; C. 天门冬酰胺; D. 谷氨酰胺; E. 核糖-1-磷酸

(13)下列氨基酸中,先以前体形式结合于多肽中,然后再进行加工的是:

- A. Pro; B. Glu; C. Gln; D. Hyp; E. Ser

(14)使用谷氨酰胺的类似物为抗代谢物不能阻断核酸代谢的环节是:

- A. UMP \rightarrow dTMP; B. IMP 的合成; C. XMP \rightarrow GMP; D. UTP \rightarrow CP; E. UMP \rightarrow

CMP

(15)关于蛋白质的空间结构,叙述正确的有:

- A. 蛋白质的二级结构包括 α -螺旋、 β -片层、 β -转角和无规卷曲;

- B. 氨基酸侧链伸向蛋白质分子表面,暴露在溶剂中;
- C. 只有极少数氨基酸的疏水侧链埋藏在分子内部;
- D. 链内二硫键也是蛋白质构象的决定因素;
- E. 以上都不正确

(16)酶能加速化学反应的进行是由于哪一种效应:

- A. 向反应体系提供能量;
- B. 降低反应的自由能变化;
- C. 降低反应的活化能;
- D. 降低底物的能量水平;
- E. 提高产物的能量水平

(17)通常血清中酶活性增高的主要原因是:

- A. 体内代谢降低,使酶的降解减少;
- B. 细胞内外某些酶被激活;
- C. 酶由尿中排出减少;
- D. 在某些器官中酶的制造增加;
- E. 细胞受损使细胞内酶释放入血

(18)由人淋巴细胞得到的变性 DNA 与人的哪种核酸不能构成杂交链:

- A. 淋巴细胞 rRNA;
- B. 肾 tRNA;
- C. 变性的线粒体 DNA;
- D. 变性的肝 DNA;
- E. 脑 mRNA

(19)哺乳动物核糖体大亚基的沉降系数是:

- A. 40S; B. 70S; C. 30S; D. 80S; E. 60S

(20)兔网织红细胞的无细胞体系,

- A. 只能合成兔血红蛋白;
- B. 只能合成兔的各种蛋白质;
- C. 只能合成哺乳类动物的血红蛋白;
- D. 可合成有特异 mRNA 的任何蛋白质;
- E. 不能合成鼠血红蛋白

北京师范大学一九九五年攻读硕士学位研究生入学考试试题

一、名词解释(每个为3分,共36分)

肽单元	电泳迁移率(R _m)
启动子	酶的活性部位
退火	持留时间(HPLC中的T _R)
反义RNA	氧化磷酸化作用
分子活力	限制性核酸内切酶
构型与构象	等电聚焦载体两性电解质

二、填空题(20分)

1. 体外合成一RNA短片段 pApUpGpApCpCpUpUpApG, 如在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 存在时转录, 被标记的磷酸基团是_____, 如在 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 存在时转录, 被标记的磷酸基团是_____。(每空格为1分)

2. 稳定蛋白质分子构象的主要作用力有_____, _____、_____, _____。(每空格0.5分)

3. 一个蛋白质分子, 在pH高于其等电点(pI)的溶液中, 其净电荷为_____值, 在pH低于其等电点(pI)的溶液中其净电荷为_____值。(每空格为1分)

4. _____提出分子遗传的中心法则。(1分)

5. EC1.1.1.27的含义_____。(2分)

6. _____证明了三羧酸循环中氧化磷酸化的P:O比为_____。(每空格为1分)

7. 与mRNA上AUG密码子结合的tRNA的反密码子为_____。(1分)

8. 聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据生物高分子的_____和_____来对它进行分离的。(每空格为1分)

9. 影响蛋白质电泳的主要因素有_____, _____、_____, _____、_____。(每空格为0.5分)

10. 在 $K_{+2} \ll K_{-1}$ 时, K_m 值可以表示酶和底物的_____。(1分)

11. 用盐析法沉淀蛋白质时, 在选用等于其pI的pH值时该蛋白质_____沉淀; 而选用远离其pI的pH值时, 该蛋白质_____沉淀。(每空格为1分)

三、回答问题(44分)

1. 凝胶过滤法的基本原理是什么? 如何用来测定一个蛋白质的分子量?(5分)

2. ^{14}C 标记的丙氨酸
$$\begin{array}{c} ^{14}\text{CH}_3 - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$$
 在动物组织中氧化后, 所得到的 α -

酮戊二酸将在哪个 C 原子上被标记? (5 分)

3. 什么是遗传密码? 试述其基本特性。(8 分)

4. 试计算一个含有 88 个氨基酸的 α -螺旋的轴长是多少? (2 分)

5. 酶的可逆抑制作用常见的有哪几种类型? 请用双倒数作图法区分其中任意两种类型, 并加以简要说明。(5 分)

6. CO_2 是脂肪酸合成的必需原料, CO_2 的功能是什么? 假若用肝脏的可溶部分与 $^{14}\text{CO}_2$ 及其他脂肪酸合成所需组分, 生成的软脂酸中是否含有 ^{14}C ? (5 分)

7. 画出底物存在时别构酶的 S 型动力学曲线, 及同时有别构激活剂或别构抑制剂存在时的曲线, 标出坐标及必要的说明文字, 并进行简要的讨论。(5 分)

8. 有一个 A 肽经酸水解后, 分析结果得知是由 Lys、His、Asp、Glu₂、Ala 以及 Val、Tyr 和两个 NH_3 分子组成的。当 A 肽与 Sanger 试剂反应后, 得到 DNP-ASP。当用羧肽酶处理后, 得到游离的缬氨酸。如果我们在实验室中将 A 肽用胰蛋白酶降解时, 得到两种肽, 其中一种(Lys、Asp、Glu、Ala、Tyr)在 pH6.4 时, 净电荷为零。另一种(His、Glu 及 Val)可给出 DNP-His, 在 pH6.4 时带正电荷。此外 A 肽有胰凝乳蛋白酶降解时, 也得到两种肽, 其中一种(Asp、Ala、Tyr)在 pH6.4 时呈中性, 另一种(Lys、His、Glu₂、以及 Val)在 pH6.4 时带正电荷。问 A 肽氨基酸排列顺序如何? (9 分)

北京师范大学一九九六年攻读硕士学位研究生入学考试试题

一、名词解释(每个2分,共30分)

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| 1. 离子交换剂 | 9. 乒乓机制 |
| 2. 滞留时间 T_R (用于 HPLC) | 10. 半不连续复制 |
| 3. 电泳迁移率 R_m | 11. RNA 聚合酶 |
| 4. 肽 | 12. DNA 变性 |
| 5. 寡聚蛋白 | 13. 衰减子(attenuator) |
| 6. 波尔(Bohr)效应 | 14. 信号识别蛋白体(SRP) |
| 7. 初速度 | 15. 激素反应元件(HRE) |
| 8. 辅酶和辅基 | |

二、填空题(每空1分,共20分)

- 测定天然蛋白质分子量的层析方法是_____,电泳方法是_____。
- 牛胰岛素由_____条肽链构成,A链由_____个氨基酸残基组成,B链由_____个氨基酸残基组成,链间和链内共含_____个二硫键。
- 在 $K_{+2} \ll K_{-1}$ 时, $K_m \approx K_S$, K_m 值可用来衡量酶和底物的_____。
- 解释别构酶作用机理的两个重要分子模型是_____和_____模型。
- 常见的酶的可逆抑制作用类型是_____和_____。
- 在酶学研究史上第一个被结晶出来的酶是_____。
- 在 Watson-Crick DNA 结构模型中,连接戊糖和磷酸的是_____键;连接各核苷酸的是_____键;连接戊糖和碱基的是_____键;在两条单链之间搭桥的是_____键。
- 化学渗透假说由英国生物化学家_____提出的。
- 酵解途径中的调节酶是_____、_____和_____。

三、问答题(每题10分,共50分)

1. 在生物化学研究中,为什么要使用缓冲液? 在使用缓冲液时应注意哪些问题?

2. 某八肽的氨基酸组成是 Lys₂, Asp, Tyr, Phe, Gly, Ser 和 Ala。此八肽与 FDNB 反应、酸水解后释放出 DNP-Ala。用胰蛋白酶水解该八肽,得到两个三肽及一个二肽,其三肽的氨基酸组成分别为 Lys, Ala, Ser, 和 Gly, Phe, Lys。用胰凝乳蛋白酶(糜蛋白酶)水解该八肽,释放出游离的 Asp 及 1 个四肽和 1 个三肽,四肽的氨基酸组成是 Lys, Ser, Phe 和 Ala, 三肽与 FDNB 反应后,经酸水解释放出 DNP-Gly。根据上述结果分析,写出该八肽的氨基酸排列顺序。并说明原因。

3. 什么是酶?

4. 试述各种核酸在蛋白质生物合成过程中已知的主要作用。

5. 如果必需氨基酸、ATP 和 GTP 都能充分供给, 血红蛋白的 β -珠蛋白链 (146 个氨基酸残基) 生物合成时, 将消耗多少高能磷酸基? 写出其步骤。

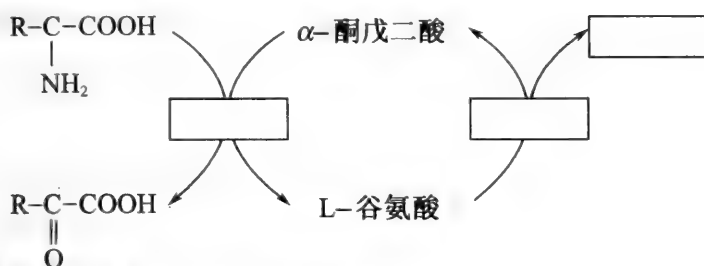
南开大学一九九六年研究生入学考试试题

一、解释题

1. 基因工程
2. 内含子
3. 糖异生作用
4. 氨基酸的互补作用
5. 兼并密码子
6. β -氧化作用

二、填空题

1. 冈崎片段是_____。
2. 含 AMP 结构的辅酶有_____。
3. 垂体前叶分泌的激素均为_____,它可以_____或_____其他内分泌腺的发育和分泌。
4. 在糖代谢中各种不同的单糖都可转化为_____糖而参与代谢。
5. 在下列反应式的方框中填入适当内容。



6. 蛋白质生物合成过程中所需的酶是_____。
7. 填入适当的物质的名称



三、是非题,如果错请说明原因

1. 人体中必需氨基酸有八种。
2. 阻遏作用和诱导作用的解释都是以乳糖操纵子学说为基础。
3. 维持蛋白质一级结构的化学键是肽键。
4. 一种辅助因子只能与一种酶蛋白结合而成为特异性的酶。
5. 乙醛酸循环存在于所有的生物体内。
6. 酶变构作用破坏的是共价键。
7. 脂肪酸的合成是 β -氧化的逆过程。
8. 共价调节酶的活动受 ATP 的共价修饰。

9. B 族维生素在体内均能构成辅酶而参加代谢。

10. 肾上腺分泌的激素均为氨基酸衍生物激素。

四、计算题

某 ATP 样品在 260nm 测得的吸收值为 1.0, 由表中查得其摩尔消光系数(ϵ) 值(260, pH7)是 15.4×10^3 , 求 ATP 的含量。(比色杯厚度为 1 厘米)

五、用代谢途径说明脂肪酸的合成过程及其与糖代谢的关系。

六、试述细胞内核酸的分布及 RNA 的主要类型、结构特点和功能。

七、蛋白质分离纯化技术中哪些与它的等电点有关? 试述这些技术分离提纯蛋白质的原理。

八、用结构式表示 NAD 和 FAD 各自的氧化还原反应式。并图示 NADH_2 的来源及其在能量产生中的地位。

首都师范大学一九九六年研究生入学试题

一、解释名词(每小题 2.5 分,共 10 分)

1. 核糖酶(riboxyme)

2. “中间产物假说”

3. K_m 及 K'_m

4. 生糖氨基酸及生酮氨基酸

二、填空题(每小题 2 分,共 18 分)

1. 目前认为大部分双底物酶促反应可能有三种反应机理:(1)(2)(3)

2. 与辅酶有关的维生素有:(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)

3. 用于 N 末端分析的主要方法有:(13)(14)(15)(16)

4. 断裂二硫键的普通方法是用(17)还原,在反应系统中还需要(18)存在,然后用(19)保护巯基。

5. 电子传递的抑制剂主要有:(20)(21)(22)等,其作用主要是阻断电子由(23)向(24)的传递。(25)有抑制电子从(26)到(27)传递的作用。(28)(29)(30)(31)等有阻断电子由(32)传至(33)的作用。

6. 由 ADP 形成 ATP 的部位是:一是在(34)和(35)之间,二是在(36)和(37)之间,三是在(38)和(39)之间。这三个形成 ATP 部位的电子传递酶复合体是(40)(41)(42)。

7. 三羧酸循环的调控酶是:(43)(44)(45)。

8. 豆蔻酸(十四烷酸)彻底氧化成 CO_2 和 H_2O 能产生(46)ATP。

9. 酶作为生物催化剂的特性:(47)(48)(49)(50)(51)

三、试述蛋白质的二级结构、超二级结构、结构域和三级结构的特点。(8 分)

四、如将 Lys、Arg、Asp、Glu、Tyr、Phe 等氨基酸混合液加在阳离子交换树脂上,然后用 pH 值连续上升的缓冲液洗脱,试预测这些氨基酸洗脱下来的先后顺序。(7 分)

五、试比较 B-DNA 和 Z-DNA 的结构特点及两者之间的关系。(7 分)

六、试述组氨酸的咪唑基在酸碱催化和共价催化中的特殊作用。(7 分)

七、试述糖酵解途径的多点调节。(8 分)

八、何谓一碳单位?一碳单位与氨基酸代谢的关系?一碳单位的生物学意义?(7 分)

九、何谓诱导修复和应急反应(SOS)?它们之间有何关系?SOS 反应对生物机体有何意义?(7 分)

十、比较反转录酶与真核生物 DNA 聚合酶的性质?(7 分)

十一、试述蛋白质的糖基化是如何完成的?(7 分)

十二、生物体内的代谢调节在不同的水平上进行,试简述“酶水平”的调节。(7 分)

华东理工大学 2000 年硕士研究生入学考试试题

一、名词解释

1. Calvin 循环 2. TATA 盒 3. 操纵子 4. 自养生物 5. 多聚核糖体
6. 区域化 7. 外显子 8. Ribozyme 9. 糖苷 10. 氧化磷酸化

二、是非题

1. 在蛋白质的一级结构中,只存在一种共价键——肽键。
2. 生物大分子由一级结构形成高级结构时伴随着分子内部熵的增加。
3. α -淀粉酶和 β -淀粉酶的区别在于 α -淀粉酶水解 α -1,4 糖苷键, β -淀粉酶水解 β -1,4 糖苷键。
4. 某些酶的 K_m 值由于代谢产物的存在而发生改变(这些代谢产物结构上与底物无关)。
5. SAM 只是一种一碳基团的载体。
6. 真核生物与原核生物在蛋白质合成过程中的一个共同点是需要 GTP。
7. 真核生物的 DNA 全部集中在细胞核中。
8. 非循环光合磷酸化既能生成 ATP 又能产生 NADPH。
9. 胞浆中的 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 通过磷酸甘油穿梭可生成 3ATP。
10. 甾体激素作用的第一步是与膜上的受体相结合后,然后激素—受体复合物被内吞进入细胞。
11. 蛋白质的溶解度随着加入中性盐后增加。
12. 磺胺类药物对细菌叶酸合成酶的抑制属于竞争性抑制。
13. DNA 聚合酶 I 在原核细胞 DNA 的辐射损伤修复中起着重要作用。

三、多选题

1. 在人体中能转变为维生素的化合物是:

- A. 酪氨酸 B. 色氨酸 C. 7-多氢胆固醇 D. 肾上腺皮质激素

2. 肽酰基转移酶在蛋白质生物合成中的作用是:

- A. 催化肽键水解 B. 使多肽链移位
C. 具有水解肽酰基-tRNA 中酯键的活力 D. 激活核蛋白体

3. 催化联合脱氨作用所需的酶是:

- A. L-氨基酸氧化酶 B. 转氨酶 C. 谷氨\酰氨酶 D. 谷氨酸脱氢酶

4. 在核酸制备过程中,通常加入 EDTA 是作为:

- A. 防止核酸变性 B. 蛋白质变性剂,使与核酸结合的蛋白质变性除去
C. 核酸酶的激活剂,防止核酸变性 D. 作为核酸变性剂

5. 三羧酸循环和有关的呼吸链反应中能产生最多 ATP 的步骤是:

- A. 柠檬酸转变成成为异柠檬酸 B. 异柠檬酸 \rightarrow α 酮戊二酸
C. α 酮戊二酸 \rightarrow 琥珀酸 D. 琥珀酸 \rightarrow 苹果酸
6. PRPP 是下列哪些代谢途径中的重要中间代谢物?
A. 嘌呤核苷酸从头合成 B. 嘧啶核苷酸从头合成
C. 嘌呤核苷酸的补救途径 D. 嘧啶核苷酸的补救途径
7. 下列激素中由同一种氨基酸衍生而来的是:
A. 肾上腺素 B. 加压素 C. 催产素 D. 甲状腺素
8. 卵磷脂水解后能产生:
A. 胆碱 B. 甘油 C. 磷酸 D. 丝氨酸
9. 下列关于哺乳动物基因特点描述错误的是:
A. 基因不连续 B. 基因不可跳跃
C. 有多次重复的碱基序列 D. 其上有与功能有关的增强子
10. 在蛋白质三级结构中经常出现的化学键有:
A. 酯键 B. 离子键 C. 氢键 D. 疏水键
11. 下列关于原核细胞 DNA 复制特点的描述错误的有:
A. RNA 银物较小 B. 冈琦片断较小
C. DNA 聚合酶 I、II、III 参与 D. 仅有一个复制起点
12. 下列哪些过程是在线粒体和胞浆两个部位进行的?
A. 糖的有氧氧化 B. 氨基酸转变成成为葡萄糖
C. 脉循环 D. 磷酸基糖旁路
13. 能使乳糖操纵子活化的因素有:
A. 乳糖 B. cAMP C. 葡萄糖 D. 降解物基因活化蛋白(CAP)
14. 下列含有糖残基的化合物有:
A. GTP B. FMN C. SAM D. 生物膜
15. 在人体中可与胆酸结合的化合物有:
A. 3-磷酸甘油 B. 甘氨酸 C. 牛磺酸 D. 胆固醇
16. 在蛋白质结构分析中:
A. 过甲酸 B. 过乙酸 C. 巯基乙醇 D. 氢氧化钠
17. 下列关于酶的专一性的叙述哪些是正确的?
A. 催化反应过程中对底物的选择性
B. 在 D 或 L 构型的化合物中能任意选择其中之一作为底物
C. 某些蛋白质水解酶对它的作用的肽键两侧有氨基酸的选择性
D. 脲酶除了能水解尿素外,还能水解与尿素结构相似的物质

四、填空题

1. 糖对生命活动的主要功能是_____和_____。

2. 在合成代谢中提供还原力的是_____,它主要是在_____途径中产生的。

3. 在氧化呼吸链上有三个氧化与磷酸化偶联部位,即_____,_____和_____能解除这种偶联关系。

4. ATP 的生成方式主要有_____和_____。

5. 柠檬酸是磷酸果糖激酶的_____剂,可_____糖的分解。

6. 乳糖操纵子上除了有三个_____外,还包括_____和_____,一般不将_____列入操纵子内。

7. 酶的可逆抑制包括_____,_____和_____。

8. 将微生物细胞悬浮液滴入 10 倍量的 -15°C 无水丙酮中,制得沉淀,经干燥后称作_____。

9. F-脉嘧啶作为化疗病人的辅助药物的原理是:它可以在体内转变为_____从而作为_____的类似物抑制_____酶的活性,最终达到抑制_____的合成。

10. 用紫外线测定法测定蛋白质和核酸溶液的浓度时,常用的波长前者是_____纳米,后者是_____纳米,两者在紫外线下具有光吸收原因是由于在它们的基本结构单位中含有_____。

11. 分子水平的基因突变可分为四种不同的类型,即_____,_____,_____和_____。

12. 丝裂霉素有抗菌和抗癌的作用,其作用原理是它能与细菌或恶性生长的细胞的_____相结合,从而抑制_____的合成。

13. RNA 的生物合成有三种类型,即_____,_____和_____。

14. 常见的一碳基团载体有_____和_____。

15. 生物氧化中的 CO_2 来源是通过脱羧酶催化_____脱羧得到的。

五、问答题

1. 何为抗体酶?它是如何制备的。

2. 什么是多利羊?它是如何诞生的?它的出现对人类会产生什么影响?

3. 分别叙述 DNA 复制转录和翻译三个过程的起始阶段?

4. 简述由于维生素 A 的缺乏引起的夜盲症。

5. 如何用实验证明酶的化学本质是蛋白质?

6. 当样品对 EDTA 透析时,某种淀粉酶制剂的活性降至对照值的 20%。当有淀粉时对 EDTA 透析,活性为对照值的 66%,你能解释这些观察结果吗?

参 考 答 案

中国科学院一九九三年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)

一、是非题

1. \checkmark ; 2. \times ; 3. \times ; 4. \times ; 5. \times ; 6. \times ; 7. \times ; 8. \times ; 9. \times ; 10. \times ;
11. \times ; 12. \times ; 13. \checkmark ; 14. \times ; 15. \times ; 16. \times ; 17. \checkmark ; 18. \times ; 19. \times ;
20. \times

二、选择题

1. (3); 2. (4); 3. (1); 4. (4); 5. (3); 6. (3); 7. (3); 8. (2); 9.
(2); 10. (3)

三、填空题

1. α -螺旋; β -折叠; β -转角; 右手超螺旋
2. 溶解性; 电荷性; 分子大小和形状; 亲合性
3. 叶酸
4. (1) 高度专一性; (2) 潜伏性; (3) 不可逆抑制性
5. 腺苷酰基化; 脱腺苷酰基
6. 葡萄糖; α (1 \rightarrow 4) 糖苷键; 葡萄糖; β (1 \rightarrow 4) 糖苷键
7. 1, 2-甘油二酯; 磷酸胆碱
8. 3
9. 7.3 千卡 (30.514 千焦耳); 2.2×10^5
10. 糖
11. 疏水作用 (键)
12. Asp; GLy; GLn; Asp; 氨甲酰磷酸
13. DNA 双链解开一半时的温度
14. 尿嘧啶核苷酸焦磷酸
15. FAD; NAD; NADP; B_{12} 辅酶
16. 脂酰肉毒碱; β -氧化; 乙酰 CoA

四、回答题

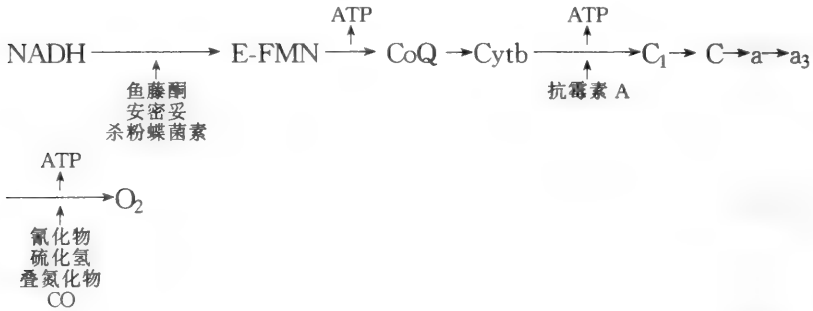
1. 见教材上册 P185 图 3-92 及说明
2. 从所给数据分析:

①细胞浆中的苹果酸脱氢酶 (甲) 的分子量、等电点比线粒体中苹果酸脱氢酶 (乙) 小; ②甲对苹果酸的亲合力、对草酰乙酸的亲合力均大于乙; ③但甲对 NADH 的亲合力小于乙; ④甲、乙对 NAD 的亲合力相同; ⑤甲与乙不易被草酰

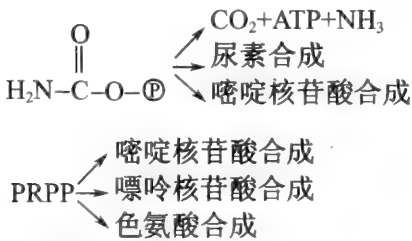
乙酸抑制。

综合上述分析可知，甲倾向于苹果酸 $\xrightarrow{NAD^+ \rightarrow NADH}$ 草酰乙酸，即苹果酸脱氢生成草酰乙酸，乙倾向于使草酰乙酸还原生成苹果酸（见教材下册 P111）

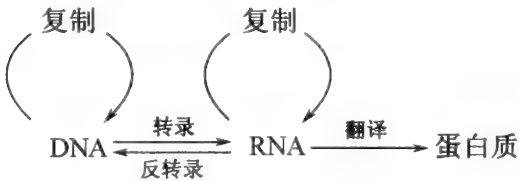
3.



4.



5. 生物学中心法则：



中国科学院一九九四年攻读硕士学位研究生入学试题 (B 卷)

一、是非题

1. ×; 2. ×; 3. √; 4. ×; 5. ×; 6. √; 7. √; 8. ×; 9. ×; 10. ×;
11. ×; 12. ×; 13. ×; 14. √; 15. √; 16. ×; 17. √; 18. √; 19. ×;
20. ×

二、选择题

1. ①; 2. ②; 3. ③; 4. ①; 5. ①; 6. ①; 7. ②; 8. ③; 9. ③; 10. ①

三、填空题

1. 负; 正

2. DNA; RNA; 蛋白质

3. 返幼激素; 蜕皮激素; 脑激素

4. 酶原与酶; 蛋白质与分子伴侣

5. 关键酶 (限速酶); 第一步

6. β -氧化; ω -氧化

7. 乙酰乙酸; β -羟丁酸; 丙酮

8. 平面脂双分子膜; 脂微球 (脂质体) (或脂-水体系; 脂-蛋白体系)

9. 转运内源性胆固醇酯

10. 亚麻酸; 亚油酸

11. 磷脂; 蛋白质

12. 一对电子通过呼吸链传至氧所产生的 ATP 数

13. ATP; Mg^{2+}

14. 次黄嘌呤; 尿酸

15. 核苷酸; 核苷二磷酸; 核苷三磷酸; 多核苷酸

16. 乙酰 CoA; 丙酮酸; 6-P-G

17. ATP; UTP; CTP; GTP

四、问答题

1. (1) 不同的蛋白质有不同的 pI, 通过调节 pH, 可使各种蛋白质分别先后达到各自 pI, 处于 pI 状态的蛋白质沉淀。也可以选用中性盐或有机溶剂、弱酸、碱分步分离。

(2) 凝胶过滤

(3) 凝胶电泳

(4) 亲和层析

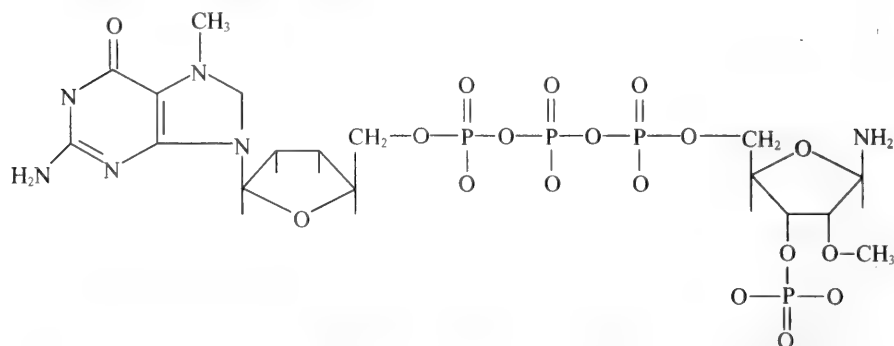
(5) 透析; 超滤

(6) 聚丙烯酰胺凝胶电泳；等电聚焦

2. 见教材上册 P426~432

3. (5) < (2) < (3) < (1) < (4) < (6)

4. 真核 mRNA 的帽子结构为： $m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1mpN$



5. ApCpUpApGOH 经蛇毒磷酸二酯酶作用产物是：A、C、U、A、G 5 个 5'-核苷酸；

经牛脾磷酸二酯酶作用的产物是：A、C、U、A、G 5 个 3'-核苷酸。

北京大学一九九一年研究生入学考试试题

一、名词解释

1. 拼接体：也叫剪接体。由 mRNA 前体及多种其他组分如细胞核小分子 RNA (snRNA) 和多种蛋白因子组成。真核 mRNA 前体的剪接是在剪接体形成之后进行的。

2. 复制子：也叫复制单位。从一个复制起点到一个复制终点所包括的 DNA 序列。

3. 反馈调节：一种作用的结果或起因对这种作用的影响叫反馈，常见的反馈是作用结果对这一作用的抑制——负反馈。

4. 别构效应：也叫变构效应。酶和蛋白质分子发挥生物活性时具有的一种构象变化，常见于寡聚酶或蛋白质。此效应往往是由于一个或一种亚基受外调节物作用构象改变，进而使其余亚基构象改变，别构效应是可逆的。

5. 抗体酶：具有酶活性的抗体。

二、写出下列英文符号的中文名称

1. THF：四氢叶酸

2. ddTPP：2', 3'-双脱氧核苷三磷酸

3. ACTH：促肾上腺激素

4. Hbs：镰刀形血红蛋白

5. tRNA^m：蛋氨酸 tRNA

6. micRNA：干扰 mRNA 的互补 RNA

7. ACP：脂酰载体蛋白

8. NADPH：还原态尼克酰胺二核苷酸磷酸

9. $\Delta G^{\circ'}$ ：标准态生物自由能

10. $Cot_{1/2}$ ：表示 DNA 复杂度，DNA 复性时 DNA 单链初始速度与复性经历时间一半 ($t_{1/2}$) 的乘积

三、填空题

1. 340nm

2. 溴化乙啶

3. 改变

4. 亚油酸；亚麻酸

5. 信号肽；20 个；疏水性；N

6. O-糖苷键；N-糖苷键

7. Klenow

8. $\alpha\beta'\delta$; δ ; 辨认起始点

9. D-环复制; 滚动环; θ ; 双向复制

10. ADP

11. HMG CoA 还原酶; 胆固醇

12. 氨甲酰磷酸; 天冬氨酸

13. 产物抑制; 核苷酸的反馈调节; 可逆磷酸化作用的共价调节

14. 色氨酸

15. 草酰乙酸

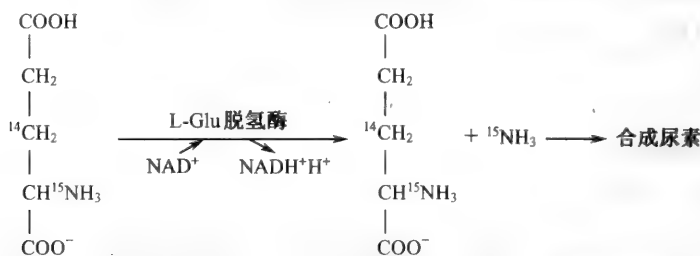
16. 其体内固氮酶系的作用将分子氮

四、是非题

1. \checkmark ; 2. \checkmark ; 3. \times ; 4. \times ; 5. \checkmark ; 6. \times ; 7. \checkmark ; 8. \checkmark ; 9. \times ; 10. \times ;
11. \times ; 12. \checkmark ; 13. \checkmark ; 14. \times ; 15. \checkmark

五、分析与计算题

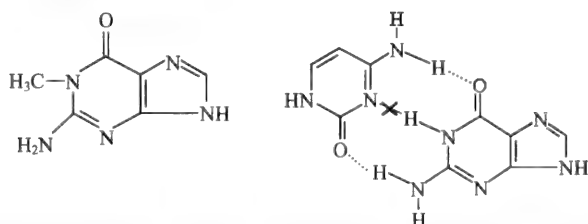
1. 答: ^{15}N 出现在尿素中, ^{14}C 出现在琥珀酸中。原因如下:



2. 答: CM-纤维素是阳离子交换层析树脂, 所以 A 的顺序为 (2) (4) (3) (1)。

当用 Sephadex G50 凝胶时, 分子量大的先洗脱下来, 所以 B 的顺序为 (2) (3) (4) (1)。

3. 答: (4) 1-甲基鸟嘌呤



从以上结构式可以看出 G 第一位甲基的引入使之不能像以前那样与 C 进行配对。

4. 答: 据题意, 我们判断转录的模板链为上面那条链, 所以 RNA 转录产物

的序列为：3'……UAAGCGAAUUCGUU……5'

5. 答：(1) $5\mu\text{l}$ 含活力单位： $\frac{5}{10^3} \times 42 \times 12 = 2.52$ 单位，由活力单位定义可知初速度 $2.52\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ 。

(2) 10min 消耗的底物 $2.52\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min}) \times 10\text{min} = 25.22.52\mu\text{mol}/\text{ml}$ ，为保证测定酶的初速度，底物消耗要低于 5%， $\frac{2.52 \times 10^{-2}}{0.05} = 0.504$ ，所以最低底物浓度为 0.504mol/L 。

6. 答：(1) 由 CNBr 降解，可知该肽 C 末端为 Met；(2) 由 Edman 法知 N 端为 Pro；(3) 从胰蛋白酶解知 C 端三肽为 Lys-Arg-Met；(4) 由凝乳蛋白酶解知：A. C 端含 Glu，B. 该含 S 氨基酸残基为 Cys，C. 该四肽的顺序为 Tyr-Arg-Glu-Met；所以此肽的氨基酸顺序为：N Pro-Phe-Ala-Cys-Phe-Tys-Arg-Glu-Met C

第一组

1. 答：(1) 可以测该制剂在 260nm 与 280nm 处的光吸收，纯 DNA $\text{nm OD}/\text{OD}_{280}$ 应为 1.8；(2) 可进行碱基含量分析，为双链时，配对方式应为 (A: T) / (G: C)

2. 答：(1) 完成复制所需时间： $1280/32 = 40\text{min}$ ；(2) $20/40 = 0.5$ 说明前一轮复制一半时，又开始了新一轮复制。第二轮的起始导致 4 个复制叉的形成。所以此时染色体上有 6 个复制叉。

第二组：

1. 答： $\frac{0.071}{100} = \frac{X}{2.6 \times 10^9}$

$$X = \frac{0.071 \times 2.6 \times 10^9}{100} = 0.1846 \times 10^7$$

$$16\text{S rRNA 拷贝数} = \frac{0.1845 \times 10^7}{503 \times 10^5} = 3048$$

2. 答：一般情况下超螺旋 DNA 迁移率最快，线形 DNA 其次，开环形最慢。

北京大学一九九二年研究生入学考试试题

一、名词解释

1. Ribozyme: 有酶活性的 rRNA。

2. 衰减子 (attenuator): 大肠杆菌色氨酸操纵子中有一段 DNA 序列叫衰减子。它既是一个终止信号, 又是一个调节信号, 位置一般在前导序列上, 只有当缺乏色氨酸时, 该操纵子中的结构基因才可通过衰减子而转录, 衰减子的这种作用叫做衰减。在其他几种氨基酸操纵子中也有衰减子存在。

3. 第二信使学说: 含氮激素首先和细胞膜受体结合, 受体将激素信号通过另外的物质传递到细胞内, 信号逐级放大后产生各种细胞内反应, 如促进或抑制相关代谢途径, 这种传递激素信号的物质叫做第二信使, 如 cAMP、cGMP 等, 这一理论叫做第二信使学说。

4. 酮体: 乙酰乙酸、 β -羟基丁酸和丙酮 3 种物质的总称, 酮体过多导致中毒。

5. 钠、钾离子泵: 跨膜转运钠、钾离子的膜蛋白, 需要 ATP, 也叫钠、钾-ATP 酶, 为四聚体蛋白。

二、写出下列英文符号的中文名称

DHU: 二氢尿嘧啶

GSH: 还原谷光甘肽

cccDNA: 共价闭环状 DNA

NADP⁺: 尼克酰胺二核苷酸磷酸

GH: 生长激素

MSH: 促黑素细胞激素

cGMP: 环鸟苷酸

LTR: 长末端重复序列

ATCase: 天冬氨酸转氨甲酰酶

PRPP: 1'-焦磷酸-5'-磷酸核糖

三、填空题

1. 5'→3'; 5'→3'; N→C

2. 内含子; 外显子

3. fMet; fMet; tRNA^{Met}; Met

4. 转化/转染

5. 三叶草型; CCA; 大多为 G

6. 细胞质膜

7. DFP (二异丙基氟磷酸); Ser 残基

8. 疏水作用力

9. 9~10

10. 染色体

11. 1, 25-二羟 D₃

12. β (1 \rightarrow 4) 糖苷键; α (1 \rightarrow 4) 糖苷键

13. ACP; CoA-SH

14. S-腺苷蛋氨酸; 四氢叶酸

15. 细胞浆; 线粒体; 线粒体内膜; 叶绿体内膜

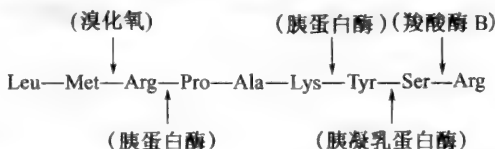
四、是非题

1. \times ; 2. \times ; 3. \times ; 4. \times ; 5. \times ; 6. \times ; 7. \times ; 8. \checkmark ; 9. \checkmark ; 10. \times ;

11. \times ; 12. \times ; 13. \times ; 14. \checkmark ; 15. \times

五、分析与计算题

1. 解: 4种专一性水解方法在下述9肽中作用位点是:



2. 解: 大肠杆菌中此蛋白质的残基数为: $4000/110 = 363.6$; 每个此种蛋白质的 α -螺旋方式存在时的长度为 $0.15 \times 363.6 = 54.54\text{nm}$; 10^6 个此种蛋白质的总长度为 $54.54 \times 10^6\text{nm} = 5.5\text{cm}$ 。

3. 解: 已知此酶 $1\mu\text{g}$ 催化反应速度为 $0.5\mu\text{mol}/\text{分}$, 此酶的活力单位为 0.5U , 此酶的比活力为: $0.5\text{U}/1\mu\text{g} = 0.5 \times 10^3\text{U}/\text{mg}$; 此酶的转换数为: $0.5/60 = 0.0083\mu\text{mol}/\text{秒}$ 。

4. 答: (1) DNA复制的忠实性保持机制为: ①以母链为模板, 通过碱基配对进行复制合成新的DNA; ②修复机制, 例如光修复、切除修复、重组修复、SOS修复等。

(2) RNA合成的忠实性保持机制为: ①以DNA为模板, 通过碱基配对进行转录合成; ②以RNA为模板, 通过碱基配对进行复制合成; ③顺式作用元件的作用; ④转录后加工中酶的作用。

(3) 蛋白质合成的忠实性保持机制为: ①mRNA自身序列的稳定性(帽子, poly A结构等); ②密码子与反密码子(mRNA-tRNA)通过氢键配对; ③AA-tRNA合成酶的选择性; ④副密码子的作用; ⑤翻译后运输、分泌, 加工中信号肽、导肽及各种加工酶的作用。

5. 答: (1) 以软脂酸 $[\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}]$ 为例, 从左侧的第一个碳原子(包括第一个碳原子)开始, 每隔一位碳原子上的H均为 ^3H , 如 $\text{C}^3\text{H}_3 - \text{CH}_2 - \text{C}^3\text{H}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}^3\text{H}_2 \cdots$ 。

(2) 标记物为 $^-\text{OOC} - \text{C}^3\text{H}_2 - \text{COSCoA}$ 时, 合成的软脂酸有14个 ^3H (延长7次, 每次2个 ^3H)。

第一组（非生化专业做）

1. 计算：

- (1)丙酮酸:15ATP; (2)葡萄糖:38ATP;
(3)NADH+H⁺:3ATP; (4)F-1,6-2P:40ATP。

2. 答：若 δ 不能离开 RNA 聚合酶的核心，RNA 聚合酶不能在模板上移动并按模板序列选择核糖核苷酸，所以延长阶段无法进行。

第二组（生化专业做）

1. 答：(1) farsomycin 抑制了多肽合成移位这一步骤。

(2) 相连。因为在肽链合成终止前，肽链是直接由最后一个掺入的 tRNA 分子上脱去的（酯键水解），脱去肽链的 tRNA 后再离开核糖体。

2. 答：首先求出产生 ATP 的摩尔数为：

$$\frac{500 \times 250 \times 24 \times 3}{22.4 \times 10^6} = 0.402 \text{M (ATP)}$$

产生的 ATP 克数为 $507 \times 0.402 = 203.71$

北京医科大学一九九三年招收硕士研究生试题

I 问答题

(1) 答：见教材 P405、P406。

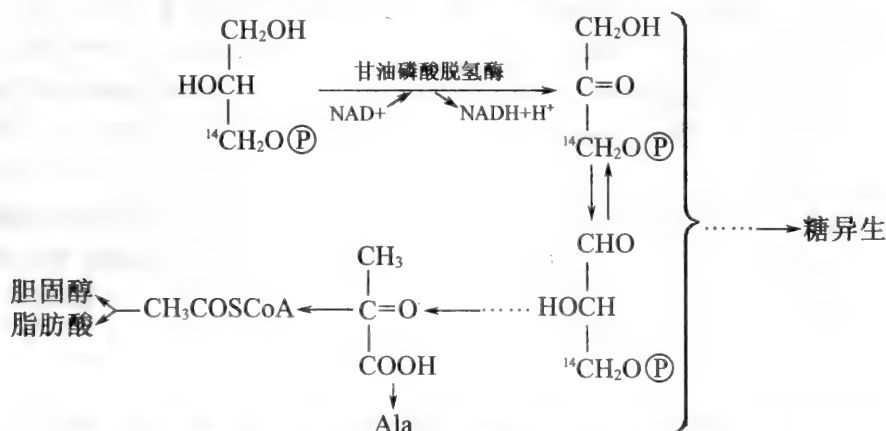
(2) 答：所谓复制就是以原来 DNA 分子为模板合成出相同分子的过程。而转录是指在 DNA 分子上合成出与其核苷酸顺序相对应的 RNA 的过程。相同点：两者都需模板，核苷酸链的延长方面均为 $5' \rightarrow 3'$ 。不同点：①底物不同，转录底物为 NTP，而复制底物为 dNTP；②酶不同，转录的主要酶为 RNA 聚合酶，而复制的主要酶是 DNA 聚合酶；③产物不同，转录产物为 RNA，而复制产物是 DNA；④转录后有加工过程，而复制有修复过程。

(3) 答：OD260 值将会降低。因为变性 DNA 在降温过程中会因复性发生减色效应，紫外吸收值降低。

(4) 答：不能。因为该酶的作用位点是 RNA 链中嘧啶核苷酸残基在 C-3' 磷酸基与下一个 C-5' 的位置断开磷酸二酯键。

(5) 答：见教材下册 P373、P374。

(6) 答：此四种化合物都含有 ^{14}C ，原因如图所示



(7) 答：①肌酸，是一重要的能量储存化合物；②谷胱甘肽，保护某些蛋白质及酶蛋白分子的巯基不被氧化，从而维持其生物学活性；③嘌呤核苷酸，核酸合成原料和能量物质；④卟啉，是血红蛋白、叶绿素、细胞色素等的核心部分。

(8) 答：因为新生儿缺少 Y 蛋白，血浆清蛋白运输的间接胆红素在肝血窦中分离后，不能迅速被肝细胞中的 Y 蛋白摄取，从而使胆红素游离出来，进入脑组织而出现中毒症状。

II 填空题 (每题 1 分, 共 20 分)

- (1) 尿酸; 痛风
- (2) 目的基因; 载体
- (3) 非蛋白质编码的间隔序列; 编码蛋白质的 DNA 序列
- (4) mRNA 的翻译起始
- (5) $5' \rightarrow 3'$; $N \rightarrow C$
- (6) AUG; UAC
- (7) 15
- (8) 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸; β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A
- (9) 蛋白质水解
- (10) CpGpApCpCpTp
- (11) 辅酶
- (12) γ -羟化酶
- (13) UDP-葡萄糖醛酸
- (14) 蛋白激酶
- (15) 62.38g/100ml
- (16) NADH-细胞色素 P_{450} 还原酶; 细胞色素 P_{450}
- (17) 乙酰辅酶 A; NADPH
- (18) 相邻; 嘧啶二聚体
- (19) HMGCoA 还原酶; HMGCoA 还原酶
- (20) UDPG; CDP-胆碱

III 选择题

- (1) B; (2) D; (3) C; (4) E; (5) D; (6) E; (7) E; (8) D; (9) B;
(10) A; (11) D; (12) 都不能; (13) E; (14) D; (15) C; (16) C; (17)
A; (18) E; (19) D; (20) B

北京医科大学一九九四年招收硕士研究生试题

I 问答题

(1) 答：所谓的 DNA 复制是指以原来的分子为模板合成出相同分子的过程。此过程可以分为原核生物 DNA 分子的复制过程和真核生物 DNA 分子的复制过程。

真核生物 DNA 复制过程需要 DNA 聚合酶 α 、DNA 聚合酶 β 、DNA 聚合酶 γ 和 DNA 连接酶。主要功能：DNA 聚合酶 α 存在于真核生物细胞核中，它可以以四种脱氧核糖核苷酸为底物，在模板链和 3'-OH 末端的引物链存在的情况下合成出与模板链的碱基互补的 DNA 链。DNA 聚合酶 α 被认为是真核生物复制的主要酶。DNA 聚合酶 β 可以多聚脱氧核糖核酸为模板合成出互补链，可能主要在 DNA 损伤修复中起作用。DNA 聚合酶 γ 可以人工合成的多聚核糖核苷酸为模板，以寡聚脱氧核糖核苷酸为引物而合成与模板链互补的 DNA 链，可能与线粒体 DNA 复制有关。不管是哪种 DNA 聚合酶，都只能是催化多核苷酸链的延长反应，不能使链之间连接。而 DNA 连接酶在供给能量的情况下可以催化双链 DNA 切口处的 5'-磷酸基和 3'-羟基生成磷酸二酯键。

原核生物的复制需 DNA 聚合酶 I、II、III。主要功能：DNA 聚合酶 I 存在于原核生物中，当有底物和模板存在时，可使脱氧核糖核苷酸逐个加到具有 3'-OH 末端的多核苷酸引物链上，从而合成出与模板链碱基互补的 DNA 链。除此功能以外，此酶还具有 5'→3' 核酸外切酶活力和 3'→5' 核酸外切酶活力。DNA 聚合酶 II 也可以四种脱氧核糖核苷酸为底物，以带有缺口的双链 DNA 作为模板合成 DNA 链，和聚合酶 I 相比，没有 5'→3' 外切酶活力。DNA 聚合酶 III 被认为是原核生物真正的 DNA 复制酶。

(2) 答：



B 基因工程大致分为以下几个步骤：外源 DNA 分离并与载体 DNA 重组；通过转化或其他方式将重组 DNA 引入受体细胞；筛选出含有重组体的克隆。

(3) 答：图略。

hnRNA 成熟为 mRNA 所需的加工过程主要有：5'-末端形成特殊的帽子结构 $m^7G5'PPP5'N_{mp}Np$ ；在 hnRNA 的 3'-末端切断并加上多聚腺苷酸尾巴；通过拼接除去由内含子转录来的序列；链的内部某些核苷被甲基化。

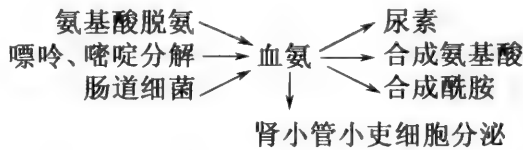
(4) 答：硬脂酸活化为硬脂酰辅酶 A 进入线粒体以后，在基质中进行 β -氧化， β -氧化步骤见教材下册 P156。

经过 7 次 β -氧化循环, 即可将硬脂酰辅酶 A 转变为 9 分子的乙酰辅酶 A。每分子乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环彻底氧化后可形成 12 分子 ATP, 因此 9 个分子的乙酰辅酶 A 共形成 $12 \times 9 = 108$ 分子 ATP。

8 次 β -氧化循环可产生 8 个 FADH_2 和 8 个 NADH , 经氧化后可以产生 $5 \times 8 = 40$ 分子 ATP。

由于硬脂酸转化为硬脂酰辅酶 A 时消耗 1 分子 ATP 的两个高能磷酸键的能量, 因此硬脂酸被彻底氧化净生成 ATP: $108 + 40 - 2 = 146$ (个)。

(5) 答:



首先通过血液把 Gln 运到肝脏, 然后肝细胞中的 Gln 酶又将其分解为 Glu 和 NH_3 。生成的 NH_3 在肝脏中通过尿素循环转化为尿素, 这样血氨就以尿素的形式排出体外。

有的动物可以将血氨转化为尿酸, 以尿酸的形式把对机体有害的物质 NH_3 排出体外。

(6) 答: 此氧化物体系是需要细胞色素 P_{450} 参加的氧化酶系, 氧化后加入一个氧原子, 故称为加单氧酶系。由于在反应中一个氧原子被还原为水, 另一个氧原子进入底物中使底物氧化, 故又称混合功能氧化物酶系。加单氧酶系的特异性较差, 可催化多种有机物质进行不同类型的氧化反应。

加单氧酶系由 NADPH、NADPH-细胞色素 P_{450} 还原酶及细胞色素 P_{450} 组成。NADH-细胞色素还原酶以 FAD、FMN 为辅酶, 二者比例为 1:1, 底物经加单氧酶系氧化生成羟化物。加单氧酶系除催化底物进行羟化反应外还可催化脱烷基反应、氧化反应等。是加单氧酶系可诱导生成。

(7) 答: 见教材上册 P245、P253、P255。

(8) 答: A. 可以选测 S 元素。因为在蛋白质中含一定量的 S 元素, 而核酸不含有此元素。

B. 方法一: 分别对 DNA 与 RNA 进行加热使之变性, 然后自动退火使之复性。用紫外分光光度计分别测量 DNA 与 RNA 紫外光吸收下降的程度, 下降程度大的是 DNA, 下降程度较小的是 RNA。原因: DNA 分子是双链分子, 变性程度较大, 而 RNA 分子双链区段很少, 变性程度较小。

方法二: 向未知溶液中加入浓盐酸与苔黑酚后加热, 产生绿色的是 RNA, 产生蓝紫色的是 DNA。

原因：因 RNA 中含有核糖，D-核糖与此试剂反应呈绿色；DNA 中含 D-2-脱氧核糖，D-2-脱氧核糖与此试剂反应产生蓝紫色。

(9) 答：磷酸化酶可以催化底物的磷酸化，如糖原磷酸化酶，糖原 \rightarrow 1-P-G；磷酸酶催化磷酸化的底物去磷酸化，6-P-G + H₂O \rightarrow 葡萄糖 + Pi；激酶是对底物具有活化作用的酶，Glc + ATP \rightarrow 6-P-G + ADP；蛋白激酶是对蛋白底物上的 Ser、Thr、Tyr 具有磷酸化作用的酶。

II 填空题（每题 1 分，共 20 分）

- (1) K_m ; V_{max}
- (2) 高密度脂蛋白; β -羟 β -甲基戊二酸单酰辅酶 A
- (3) 产生磷酸戊糖与 NADPH
- (4) 共价调节; 别构调节
- (5) UDP; UTP
- (6) Gly; Ser
- (7) 泛酸; 维生素 PP 或称尼克酰胺
- (8) 15 个
- (9) Asn
- (10) 左; 12
- (11) 25 (OH) D₃ \rightarrow 1, 25 - (OH)₂D₃ 受阻
- (12) 操纵子
- (13) 血浆清蛋白或 α_1 球蛋白
- (14) 葡萄糖醛酸
- (15) 1, 25 二羟维生素 D₃
- (16) 变性; 复性
- (17) 酪氨酸酶
- (18) RNA 聚合酶 β
- (19) 3; 2
- (20) UDPG; CDP-胆碱

III 选择题

- (1) C; (2) C; (3) D; (4) A; (5) D; (6) A; (7) C; (8) D; (9) C;
(10) C; (11) D; (12) D; (13) D; (14) A; (15) E; (16) C; (17) E;
(18) C; (19) E; (20) B

北京师范大学一九九五年攻读硕士学位研究生入学考试试题

一、名词解释

肽单元：肽链主链上的重复结构叫肽单元，每一个肽单元实际上就是一个肽平面。

启动子：DNA 分子中结合转录酶和启动转录的序列，如原核生物的 -35 序列。

退火：即 DNA 由单链复性为双链结构的过程或作用，来源相同的 DNA 单链经退火后完全恢复双链结构，同源 DNA 之间、DNA 和 RNA 之间退火后形成杂交分子。

反义 RNA：和 DNA 分子中某一基因序列可互补的 RNA，这种互补会阻止这一基因的转录。

构型与构象：有机大分子两类空间结构，构型来自分子中各原子特有的固定的空间排列，构象来自 δ 键旋转引起的分子中各原子空间排列，前者改变时共价键断裂。

电泳迁移率 (R_m)：又称泳动度，指在一定的介质中，单位电场强度电泳时移动的速度。

酶的活性部位：与酶催化活性密切相关的酶的空间微区，常由若干个氨基酸残基形成，如丝氨酸、天冬氨酸等，活性部位又有可分为催化位、结合位等。

滞留时间 (HPLC 中 T_R)：被分离物质在高压液相色谱柱中经过的时间 (从进到出)。

氧化磷酸化作用：伴随生物氧化放能而进行的储能 ($ADP \rightarrow ATP$) 过程，有底物水平、呼吸链式和光合磷酸化式 3 种。氧化磷酸化是一个放能和储能的偶联过程，也是一个能量方式转化的过程。

限制性核酸内切酶：简称限制酶。来自细菌，以两链 4~8 个核苷酸序列为专一性位点切割 DNA 分子，产物为带有平头和粘性末端的 DNA 双链片段，限制酶使 DNA 人工重组成为现实。

等电聚焦载体两性电解质：等电聚焦使用的两性电解质载体，在一定的电场条件下，两性电解质作为电泳介质可以形成电位梯度，和该梯度中某一等电点相同的待分离物质聚集在同一位置。

二、填空题

1. 5'端 A；磷酸二酯键中的磷原子
2. 疏水作用；亲水作用；盐键；范德华力；氢键
3. 负值；正值

4. Crick

5. 第一大类；第一亚类；第一亚亚类；第 27 种酶

6. S. Ochoa; 3

7. UAC

8. 净电荷；分子量大小

9. 介质离子强度；pH；电场强度；净电荷；分子量

10. 亲合力

11. 容易；不容易

三、回答问题

1. 凝胶过滤的基本原理是不同大小的分子混物流经凝胶层析柱时，比凝胶网孔大的分子不能进入珠内网状结构而随溶剂首先流出柱外；比网孔小的分子能不同程度地自由出入凝胶柱内外。这样由于不同大小分子所经的路径不同而得到分离。

根据上述原理，如果首先用几种标准蛋白进行凝胶过滤，求得洗脱体积 (V_e) 后，以标准蛋白的分子量对数 ($\log M$) 对 V_e 做图得一直线，再测出待测蛋白质的 V_e ，即可从图中确定它的分子量。

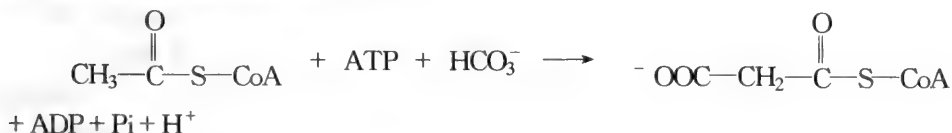
2. $\text{HOOC}^{14}\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{COOH}$

3. mRNA 分子中编码氨基酸的核苷酸序列，为三联体密码子，遗传密码的基本特性：①简并性，大多数氨基酸都有几组不同的密码子；②无标点符号，即密码子之间无标点符号间隔；③不重叠性，但有少数例外；④通用性，所有生物的遗传密码是几乎一样的，线粒体等有例外；⑤64 组密码子中有 3 个专用终止密码子，AUG 既是 Met 密码子，又是起始密码子。

4. $0.15 \times 88 = 13.20\text{\AA}$

5. 酶的可逆抑制有 3 种类型：竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制。作图见教材下册 P263 图 4-12，P265 图 4-13、图 4-14。

6. 在脂肪酸从头合成中的反应：



说明 CO_2 是乙酰 CoA 羧化酶的底物之一。

无。因为来自 CO_2 的碳原子在生成乙酰乙酸时被再次以 CO_2 方式脱去。

7. 见教材上册 P230~P304。

8. 解：①由酸水解结果知此 A 肽为 8 肽，组分为 Lys、His、Asp、2Gln、Ala、Val、Tyr；②由 DNP 反应可知，此 8 肽为非环肽，N 端为 Asp；③由羧肽

酶处理结果知，此 8 肽 C 端为 Val；④由胰蛋白酶作用结果知，此 8 肽的两个片段可能为：Asp-Gln-Ala-Tyr-Lys、His-Gln-Val；⑤由胰凝乳蛋白酶等作用结果知，此 8 肽的两个片段可能为 Asp-Ala-Tyr、Lys-Gln-Gln-His-Val。综合上述分析，此 8 肽的顺序为：Asp-Ala-Tyr-Gln-Lys-His-Gln-Val

北京师范大学一九九六年攻读硕士学位研究生入学考试试题

一、名词解释

1. 离子交换剂：能够进行离子交换层析的树脂，携带有带电基团的球形颗粒，分为阴、阳（碱性、酸性）性二类。
2. 持留时间 T_R （用于 HPLC）：见 1995 答案。
3. 电泳迁移率（ R_m ）：见 1995 答案。
4. 肽：由氨基酸通过肽键相连而成的物质。
5. 寡聚蛋白：由二条或二条以上肽链组成的蛋白质，肽链数通常为偶数，多具别构能力。
6. 波尔效应：血红蛋白释放氧气受 H^+ 和 CO_2 促进的效应，由 C. Bohr 于 1914 年发现，波尔效应是由于 H^+ 和 CO_2 促使血红蛋白 4 个亚基之间形成盐桥。
7. 初速度：反应开始时的速度，如酶促反应，因酶促速度与底物浓度的关系常呈现双曲线，只有在反应开始时呈现一级反应，故常用初速度表示酶促反应速度。
8. 辅酶和辅基：B 族维生素是以辅酶或辅基形式和酶蛋白结合而发挥作用的。辅酶或辅基的结构多为对应维生素的核苷酸衍生物，这些衍生物和酶蛋白结合紧密者谓之辅基，反之谓之辅酶。
9. 乒乓机制：这是解释双底物酶促反应机制的理论之一，酶首先和一种底物反应并释放出产物，其间辅酶结构转变，然后再同另外一种底物反应并释放出第二种产物。
10. 半不连续复制：DNA 二条链中一条为连续复制，另一条为不连续复制时谓之半不连续复制。
11. RNA 聚合酶：以 DNA 为模板合成 RNA 的酶，又称转录酶，原核生物和真核生物有不同的转录酶。
12. DNA 变性：即 DNA 双链解开成链，生物活性丧失。
13. 衰减子：衰减子是 DNA 分子中的一段顺序，首先发现于大肠杆菌色氨酸操纵子中，此段顺序受色氨酸浓度影响后可形成局部折叠，阻止 RNA 合成酶通过和作用，从而减慢色氨酸合成的速度。
14. 信号识别蛋白体（SRP）：细胞膜的组分之一，激素等细胞外信号分子通过 SRP 实现胞外信号向膜内传递。
15. 激素反应元件（HRE）：是指 DNA 分子中担负接受非膜受体激素的序列。

二、填空题

1. 凝胶过滤；聚丙烯酰胺凝胶电泳
2. 2；21；30；3
3. 亲合力
4. 序变；齐变
5. 竞争性；非竞争性
6. 脲酶
7. 磷酸酯键；3', 5'-磷酸二酯键；糖苷键；氢键
8. Mitchell
9. 己糖激酶；二磷酸果糖激酶；丙酮酸激酶

三、问答题

1. 生物化学研究的对象是生物化学反应，生化反应发生在生物体中，有相对稳定的生理 pH，酶的作用需要最适 pH，所以在体内研究时要用缓冲液。使用缓冲液时要注意：使用的缓冲液要维持生物化学研究所需的最适 pH；使用的缓冲液不能加入对酶或其他生命物质活性有抑制作用的物质；

2. 解：①由题意知，此八肽的组成为：Lys₂、Asp、Tyr、Phe、Gly、Ser、Ala；②由 FDNB 反应结果知，此八肽为开环肽，N 端为 Ala；③由胰蛋白酶作用结果知，此八肽可能有两个片段：Ala-Ser-Lys、Gly-phe-Lys-Tyr-Asp；④由胰凝乳蛋白酶作用结果知，此八肽顺序为：Ala-Ser-Lys-Phe-Gly-Lys-Tyr-Asp。用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶对上述结构顺序的八肽进行水解，可知此推断是正确的。

3. 答：酶是生物催化剂，其化学本质为蛋白质。近年来发现 RNA 也有催化活性。酶有高度专一性、高效率、在生理条件下作用等特点。化学本质为蛋白质的酶分为单纯和结合两大类；结合类酶有辅因子，如 B 族维生素的辅酶式辅基、无机离子等；酶的量、活性可调。本质为核酸的酶催化对象已知的仅为核酸。酶的本质、作用机理仍有待进一步认识。

4. 在蛋白质生物合成过程中已知核酸的作用有：①mRNA 的模板作用，mRNA 的三联体密码子编码 20 种氨基酸和终止子、起始子；②tRNA 携带氨基酸对号入座，tRNA 分子中存在反密码子，结构辨认 mRNA 分子中的密码子，一种氨基酸可有多种 tRNA；③rRNA 参与核糖体的组装。

5. 蛋白质生物合成有三步反应耗能：①氨基酸 + ATP → 氨基酸-AMP-酶 + PPi；②30S 亚基 + 50S 亚基 + mRNA + fMet-tRNA + IF₁ + IF₂ + IF₃ + GTP → GDP + 70S 起始复合物；③Tu-Ts + GTP → Tu-GDP + Ts。这三步耗能反应相当于需要 4 分子 ATP。合成 146 个氨基酸残基的 β-珠蛋白链需要的 ATP 数为：氨基酸活化，2 × 146 = 292ATP；起始复合物形成，1 ATP；移位 145 次，145ATP；总共消耗 292 + 1 + 145 = 438 (ATP)

南开大学一九九六年研究生入学考试试题

一、解释题

1. 基因工程：利用限制性内切酶和载体，按照预先设计的要求，将一种生物的某种目的基因和载体 DNA 重组后转入另一生物细胞中进行复制、转录和表达，一般而言，基因工程就是 DNA 重组技术。

2. 内含子：真核生物基因不连续，是由外显子和内含子相间组成。它们均为 DNA 序列且同时转录，但内含子部分在转录后加工中一般要除去。有时在一种基因中的内含子序列，在另一种基因中则可以是外显子序列。

3. 糖异生：非糖物质转变为糖的过程，糖异生反应不同于糖酵解之处在于有三个绕道反应。

4. 氨基酸的互补作用：又称蛋白质的互补作用，营养价值高（必需氨基酸含量高）的蛋白质和营养价值低（必需氨基酸含量少）的蛋白质混合食用，从而实现必需氨基酸互相补充。

5. 兼并密码子：大多数氨基酸都可有几组不同密码子，编码相同氨基酸的不同密码子叫做兼并密码子或同义密码子。

6. β -氧化作用：脂肪酸氧化分解的主要途径。因脱氢和裂解均发生在 β -位碳原子而得名。 β -氧化的直接产物是乙酰 CoA。

二、填空题

1. DNA 不连续复制过程中首先合成的 DNA 片段，这些片段然后相连成完整的 DNA 链。

2. NAD、NADP、CoA、 B_{12} 辅酶、FAD。

3. 含氮激素；抑制；促进

4. 葡萄糖

5. 转氨酶；L-谷氨酸脱氢酶； NH_3

6. 氨酰 tRNA 合成酶、甲酰化酶、肽酰转移酶、移位酶

7. 左侧为：糖；脂肪酸；部分氨基酸碳骨架。右侧为：脂肪酸及脂类；氨基酸； $CO_2 + H_2O$

三、是非题：

1. \times ，人体和动物必需氨基酸有 10 种。

2. \times ，诱导作用解释以乳糖操纵子学说为基础，阻遏以色氨酸操纵子学说为基础。

3. \times ，维持蛋白质一级结构的化学键除肽键外，还有二硫键。

4. \times ，辅因子相同，酶蛋白可不同。

5. ×, 乙醛酸循环仅存在于植物和微生物。

6. ×, 酶变构作用破坏的是非共价键。

7. ×, 脂肪酸合成中的从头合成类似于 β -氧化, 但酶不同, 反应进行的细胞部位不同。

8. ✓

9. ✓

10. ×, 肾上腺髓质分泌激素为氨基酸衍生物, 肾上腺皮质分泌类固醇激素。

四、计算题

解: 根据郎伯-比耳公式 $A = a_m c l$, 已知 $A = 1$, $a_m = 1.54 \times 10^3$, $L = 1$, 求 $C = ?$

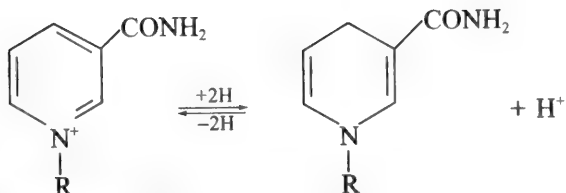
$$C = A / (a_m l) = 1 / (1.54 \times 10^3 \times 1) = 0.05 \times 10^{-3} \text{M}$$

五、答: 脂肪酸合成起始物质为乙酰 CoA、 NADPH_2 , 乙酰 CoA 来自糖的有氧分解, NADPH_2 来自磷酸戊糖途径。代谢途径略。

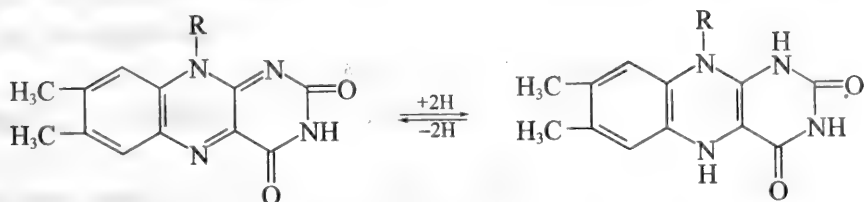
六、核酸有 DNA 和 RNA 两大类。DNA 分布于细胞核染色体、线粒体和叶绿体及质粒中, RNA 主要分布于细胞质中, rRNA 集中分布在核糖体中。RNA 有三种类型, mRNA、tRNA 和 rRNA。RNA 常呈现单链, 核糖为非脱氧核糖, 碱基以 A、G、C、U 为主, 有稀有碱基存在, 碱基修饰以甲基化为主。RNA 可局部回折成双链状。mRNA 为遗传密码携带者, 直接指导蛋白质合成。mRNA 既可以代表一个基因, 也可以代表多个基因, 且有不翻译序列存在, 可进行重新拼接和其他加工修饰。tRNA 分子量均一, 携带氨基酸对号入座, 二级结构为三叶草型, 有四环三臂, 反密码子处于反密码环中, 氨基酸臂有 CCA 共同结构, 三级结构呈倒 L 型, RNA 还有密码子突变的校正等作用。rRNA 为核糖体的组分, 与蛋白质生物合成过程多种作用有关, 其作用机理有待进一步研究, 有些 rRNA 具有酶活性, 如四膜虫中 rRNA 的自我拼接。

七、答: ①根据各种蛋白质的 pI 的不同, 选用不同的 pH 条件可使蛋白质混合物实现各组分分段沉淀; ②在聚丙烯酰胺凝胶等支持物电泳中, 选用不同的电泳介质 pH, 使 pI 相同的蛋白质处于一条电泳带; ③在等电聚焦技术中, 和两性电解质形成的 pH 梯度相同的蛋白质分别聚焦; ④在离子交换技术中, 通过调节介质 pH 使待分离蛋白质携带不同的静电荷。

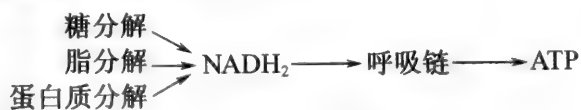
八、NAD 的氧化还原反应式为:



FAD 的氧化还原反应式为：



NADH₂ 的来源及其在能量产生中的地位：



首都师范大学一九九六年研究生入学试题

一、解释名词

1. 核糖酶 (riboxyme): 具有催化活性的 RNA。

2. “中间产物假说”: 一种解释酶反应速度与底物浓度关系的假说。该假说认为酶与底物先形成一个中间物, 此中间产物亦被人们看作是稳定的过渡态物质。中间物再进一步分解成为产物与游离态的酶。

3. K_m : 是酶反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度。 K'_m : 表观米氏常数。

4. 生糖氨基酸: 分解的中间物可以转化为糖的氨基酸。生酮氨基酸: 分解产物为酮体的氨基酸。

二、填空题

1. 依次反应机理、随机机理、乒乓反应机理

2. V_{B1} 、 V_{B2} 、 V_{B6} 、 V_{B12} 、烟酰胺、泛酸、生物素、叶酸、硫辛酸

3. DNFB 法、DNS 法、PITC 法、氨肽酶法

4. β -巯基乙醇; 8mol/L 尿素或 6mol/L 盐酸胍; 碘乙酸

5. 鱼藤酮、安密妥、杀粉蝶菌素; NADH; CoQ; 抗霉素 A; Cytb; Cytc; 氰化物、硫化氢、CO、叠氮化物; Cytaa₃; O₂

6. FMN; CoQ; Cytb; Cytc₁; Cytaa₃; O₂

7. 柠檬酸合成酶、柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶

8. 112

9. 催化效率高; 高度专一性; 易失活; 酶活力的调节控制; 酶的催化活力与辅酶、辅基和金属离子有关

三、答: 二级结构是指多肽链主链中的扭曲, 维持二级结构的作用力是氢键。超二级结构是若干相邻的二级结构单元组合在一起, 形成的有规则的二级结构组合体, 超二级结构在结构的组织层次上高于二级结构, 但没有形成完整的结构域。结构域是相对独立的三维实体, 组织层次上介于超二级结构与三级结构之间。三级结构是指单体蛋白质分子或蛋白质分子亚基的三维空间结构, 维持蛋白质三级结构的作用力主要是范德华力、氢键、静电相互作用和疏水相互作用。

四、答: 阳离子交换柱层析中氨基酸的洗出顺序大体上是酸性氨基酸、中性氨基酸、碱性氨基酸, 所以此氨基酸混合物的洗脱顺序为: Asp、Glu、Phe、Tyr、Lys、Arg

五、答: 见教材下册 P339。

六、答: 在共价催化中, His 的咪唑基作为强有力的亲核基团, 可以提供电

子，它可以通过与底物形成一个反应活性很高的共价中间物，降低反应活化能，而使得反应较易进行。在酸碱催化中，His 的咪唑基既可做为质子供体，又可作为质子受体在酶反应中发挥作用。

七、答：见教材下册 P120。

八、答：见教材下册 P248、P249、P250。

九、答：见教材下册 P349、P350。

十、答：见教材下册 P352。

十一、答：糖蛋白的前体自粗糙内质网上的核糖体合成时，其新生肽链伸入内质网腔。粗糙内质网腔中合成的寡糖链，在粗糙内质网膜上糖苷转移酶的催化下通过磷酸长萜醇的介导，可将寡糖链能转移给新生的多肽链。在粗糙内质网腔中形成的糖蛋白，糖链与 Asn 的酰胺氮相连。糖蛋白从粗糙内质网腔运至高尔基体后，在高尔基体中经进一步改造，有的糖链可由与酰胺氮相连转变为与 Ser、Tyr、Thr 羟基上的氧相连。

十二、答：酶水平的调节主要有两种方式：一种是通过激活或抑制以改变细胞内已有酶分子的催化活性；另一种是通过影响酶分子的合成或降解以改变酶分子的含量。酶活性的调节包括酶的变构效应和共价修饰两种方式。代谢调节作用分别称为前馈和反馈，这种作用或是激活，或是抑制。在连锁代谢反应中，酶受到连续的共价修饰所激活，导致原始信号的放大。这样的连锁代谢反应系统称为级联系统。激素或神经递质作用于膜受体，经信号转导产生第二信使，并连续引起酶的磷酸化，从而调节细胞代谢。

华东理工大学 2000 年硕士研究生入学考试试题

一、名词解释

1. 也叫三碳循环. 是光合作用中主要的暗反应. 1, 5-二磷酸核酮糖结合 CO_2 后形成三碳的 3-磷酸甘油酸后在缩合成为己糖。

2. 属于原核生物 DNA 转录启动子序列结构. 位于大肠杆菌 DNA 分子转录起点前 -10 处的保守碱基序列. 通常由 5 个共同的富含 A、T 的核苷酸序列组成。

3. 略

4. 全部所需的有机物质由自身合成的生物。如光能自养的植物和化能自养的细菌。

5. 略。

6. 细胞内部各种担负不同功能的细胞器的形成。

7. 真核生物 DNA 分子转录合成 RNA 后有自我剪接过程, 被切除掉的部分对应的 DNA 序列叫内含子, 转录后经过剪接后被保留的 RNA 所对应的 DNA 序列叫做外显子。

8. 即化学本质为核酸的酶。

9. 略。

10. 略。

二、是非题

1. \times 还有二硫键、C—C 键等

2. \times 应为减少。(严格说来, 这一命题缺少准确答案, 蛋白质折叠与熵变的关系至今尚无定论)。

3. \times α 、 β 淀粉酶均水解 α -糖苷键, 只是二者水解的位点和产物不同。 α -淀粉酶从淀粉的内部切割 1, 4-糖苷键, 产物为麦芽糖和极限糊精及少量葡萄糖, 而 β -淀粉酶从非还原性末端顺次水解淀粉成为 β -麦芽糖。

4. \times , 酶的 K_m 虽然是酶的特征常数, 但随着竞争性抑制剂的加入而改变。结构和底物无关的代谢产物不会对酶有竞争性抑制, 所以对酶的 K_m 无影响。

5. \checkmark , SAM 是 S-腺苷蛋氨酸的缩写。

6. \checkmark 。

7. \times 。真核生物的线粒体、叶绿体中也有遗传物质。

8. \checkmark 。

9. \times 。线粒体中的 3-磷酸甘油脱氢酶的辅基是 FAD, 为此只产生 2 分子

ATP。

10. ×。甾体激素体积小，直接进入胞浆后转移受体结合，然后作用于细胞核内的DNA。

11. ×。向蛋白质溶液中加入少量中性盐时可增加蛋白质在水中的溶解度，随着加入中性盐的数量增加，蛋白质的水溶性反而会降低。原因有两个，一是中性盐解离后的带电离子会中和蛋白质胶粒外围电荷，二是极溶于水的中性盐会夺取蛋白质胶粒外围水化层。

12. √。

13. √。

三、多选题

1. B、C；2. AC；3. BD；4. C；5. BC；6. ABC；7. AD；8. ABC；9. B；10. BCD；11. BC；12. ABC；13. ABD；14. AC；15. BD；16. AC；17. AC

四、填空题

1. 能量；识别信息

2. $\text{NADH} + \text{H}^+$ ；HMP

3. $\text{NAD}-\text{COQ}$ ； $\text{COQ}-\text{Cyt c}$ ； $\text{Cyt a}-\text{O}_2$ ；2, 4 二硝基苯酚

4. 底物水平磷酸化；氧化磷酸化

5. 抑制剂；抑制

6. 结构基因；启动基因；操纵基因；调节基因

7. 竞争；非竞争；反竞争抑制

8. 菌粉

9. fdUMP；dUMP；脱氧胸苷酸合成酶；dTMP/DNA；见下册 P384

10. 280；260；苯环

11. 颠换 转换 插入/缺失 移码

12. DNA DNA

13. 复制；转录；多核苷酸磷酸化酶

14. SAM；FH4

15. 含羧基的氨基酸 糖代谢的中间物/氧化/底物（丙酮酸 酮戊二酸 异柠檬酸）（此题的答案有多种）

五、问答题

1. 见上册 P294。具有酶活性的抗体叫做抗体酶。以具有酯酶活性的抗体酶为例，用共价键连接着磷酸基的酯酶水解作用产生的过渡态的磷酸酯类似物免疫小鼠，获得对这个酯水解反应有催化作用的抗体，这个抗体专一性结合在酯水解过渡态分子上。

2. 多利羊诞生过程为，首先将同一只羊的体细胞和乳腺细胞分离，取出体

细胞的细胞核并移植到已经除去细胞核的乳腺细胞中，获得体细胞核的如乳腺细胞繁殖分化出和原体细胞的个体。

多利羊的出现打破了多细胞个体动物必须经过有性生殖才能获得后代繁殖模式，对人类婚姻关系的基本作用——繁殖后代带来冲击，进而对建立社会的基本单位——家庭的作用带来新的思考，与此同时，器官克隆成为现实，自体器官移植可以减少异体器官移植带来的免疫排斥，通过体细胞克隆，可以大力发展生物制药，预防和根治疾病，从而延长人体寿命。

如同原子核技术一样，人类会通过立法和道德约束防止滥用体细胞克隆技术。

3. 略。此题是一道综合题，必须注意紧紧围绕 DNA 表达三个过程的起始阶段回答。

4. 维生素 A（视黄醇）是眼睛视网膜中棒状细胞视紫红质组分——视黄醛的还原形式，棒状细胞感受暗光时，11-顺式视黄醛异构和被还原成为全反式视黄醇，这个过程是可逆的。通过视黄醛-视黄醇之间的不断异构和氧化还原，实现对暗光的感受。当缺少维生素 A 时，视紫红质糖蛋白缺少视紫质辅基而不能成为完整功能蛋白，所以不能感受暗光。见上册 P351。

5. 最可靠的方法是获得酶的结晶，通过对酶的结晶结构分析可以得知酶的全部化学结构，历史上证明酶的化学本质是蛋白质首先是通过脲酶的结晶和结构分析后正式确立的。简单的方法可以通过双缩脲反应进行。

6. 淀粉可以和淀粉酶所需的 Mg^{2+} 辅因子结合从而减少透析时被 EDTA 结合的数量。

参 考 文 献

- 国家自然科学基金委员会. 1995. 生物化学与分子生物学. 北京: 科学出版社
- 李德宝, 徐平. 1994. 重组 DNA 的原理和方法. 杭州: 浙江科学技术出版社
- 罗进贤. 1987. 分子生物学引论. 广州: 中山大学出版社
- 邱泽生. 1992. 基因工程. 北京: 首都师范大学出版社
- 沈郭瑜, 郭顺勤. 1993. 生物无机化学. 成都: 成都科技大学出版社
- 沈同, 王镜岩等. 1990. 生物化学. 第二版. 北京: 高等教育出版社
- 孙乃恩, 孙车旭, 朱德煦. 1995. 分子遗传学. 南京: 南京大学出版社
- 陶慰孙等. 1984. 生物化学和分子生物学习题与计算. 北京: 高等教育出版社
- 天津轻工业学, 无锡轻工业学院. 1992. 食品生物化学. 北京: 中国轻工业出版社
- 杨岐生. 1994. 分子生物学基础. 杭州: 浙江大学出版社
- 朱玉贤, 李毅. 1997. 现代分子生物学. 北京: 高等教育出版社
- 邹承鲁. 1997. 第二遗传密码吗——新生肽链及蛋白质折叠的研究. 长沙: 湖南科学技术出版社
- L H 西格尔. 1984. 生物化学计算. 怎样解决普通生物化学中的数学问题. 吴经才, 张光兴等译. 北京: 科学出版社
- W B Wood 等. 1987. 生物化学习题入门. 姚仁杰等译. 北京: 北京大学出版社

S0003526

58.173
126

1999.6

潘立贞 04.5.31
 董永修 2012年3月21日
 侯 2015年3月22日

000027848

(Q-0836.0104)

责任编辑: 马学海

封面设计: 高海英

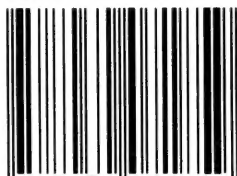
高等院校选用教材

分子细胞生物学 (第二版)	韩贻仁	主编 / 定价: 69.00 元
现代遗传学原理	徐晋麟 徐沁 陈淳	编著 / 定价: 68.00 元
分子遗传学	李振刚	编著 / 定价: 30.00 元
现代生命科学概论	刘广发	编著 / 定价: 25.00 元
生物化学与分子生物学原理	王联结	主编 / 定价: 20.00 元
生态学	李振基 陈小麟 郑海雷 连玉武	编著 / 定价: 24.00 元
生物技术概论	宋思扬 等	编著 / 定价: 18.00 元
计算机在生物医学中的应用 (第二版)	庄天戈	著 / 定价: 33.00 元
动物生物学	陈品健	主编 / 定价: 50.00 元
海洋生态学 (第二版)	沈国英 施并章	主编 / 定价: 38.00 元
生理心理学	李新旺	编著 / 定价: 20.00 元

面向21世纪课程教材

植物生物学	杨世杰	主编 / 定价: 46.00 元
病原生物学	周正任 潘兴瑜	主编 / 定价: 35.00 元
医用物理学	王芝云	主编 / 定价: 27.00 元
基础化学	慕慧	主编 / 定价: 26.00 元
实验生理科学教程	陈克敏	主编 / 定价: 20.00 元

ISBN 7-03-007185-9



9 787030 071859 >

ISBN 7-03-007185-9/Q · 836

定 价: 20.00 元